

## PCT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

HATORI, Osamu  
Akasaka HKN Building, 6th floor  
8-6, Akasaka 1-chome  
Minato-ku  
Tokyo 107-0052  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 09 July 1999 (09.07.99)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
Applicant's or agent's file reference P98-084	
International application No. PCT/JP99/02690	
International publication date (day/month/year) Not yet published	
International filing date (day/month/year) 21 May 1999 (21.05.99)	Priority date (day/month/year) 29 May 1998 (29.05.98)
Applicant KAO CORPORATION et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c)** which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c)** which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
29 May 1998 (29.05.98)	10/149041	JP	09 July 1999 (09.07.99)
05 Octo 1998 (05.10.98)	10/282689	JP	09 July 1999 (09.07.99)
05 Octo 1998 (05.10.98)	10/282690	JP	09 July 1999 (09.07.99)
25 Dece 1998 (25.12.98)	10/371607	JP	09 July 1999 (09.07.99)

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Carlos Naranjo

Telephone No. (41-22) 338.83.38

002724192

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



PATENT COOPERATION TREATY

WO 99/62370  
PCT/JP99/02690

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

**NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES**

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

HATORI, Osamu  
Akasaka HKN Building, 6th floor  
8-6, Akasaka 1-chome  
Minato-ku  
Tokyo 107-0052  
JAPON

Date of mailing (day/month/year)

09 December 1999 (09.12.99)

Applicant's or agent's file reference

P98-084

**IMPORTANT NOTICE**

International application No.

PCT/JP99/02690

International filing date (day/month/year)

21 May 1999 (21.05.99)

Priority date (day/month/year)

29 May 1998 (29.05.98)

Applicant

KAO CORPORATION et al

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

EP,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

None

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 09 December 1999 (09.12.99) under No. WO 99/62370

**REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)**

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

**REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))**

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/30.1 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

J. Zahra

Telephone No. (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

09 December 1999 (09.12.99)

International application No.:

PCT/JP99/02690

Applicant's or agent's file reference:

P98-084

International filing date:

21 May 1999 (21.05.99)

Priority date:

29 May 1998 (29.05.98)

Applicant:

OTSUJI, Kazuya et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

02 July 1999 (02.07.99)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P98-084	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/02690	International filing date (day/month/year) 21 May 1999 (21.05.99)	Priority date (day/month/year) 29 May 1998 (29.05.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A46B 5/04		
Applicant KAO CORPORATION		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 02 July 1999 (02.07.99)	Date of completion of this report 24 September 1999 (24.09.1999)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.





## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/02690

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/JP 99/02690

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	6-10	YES
	Claims	1-5	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

- Document 5 (JP, 63-115333, U (Seiho Freizu KK), July 25, 1988 (25.07.88) (Family: none)

In the light of the design disclosed in Document 5, the invention described in Claim 1 can be considered to follow plainly and logically from the prior art, and thus does not involve the exercise of skill beyond that to be expected of a person skilled in the art.

- Suitable selection of the maximum compression load of brush projections, the height of the brush projections and the radius of curvature of the tip of the brush projections was common practice in the brush field prior to the present application, and applying this common practice prior to the present application to the design disclosed in Document 5 and selecting a suitable maximum compression load of brush projections, height of the brush projects and radius of curvature of the tip of the brush projections to give the invention as described in Claims 2-4 follows plainly and logically from the prior art and thus does not involve the exercise of skill beyond that to be expected of a person skilled in the art.

- The pulp moulding technique was known within the pulp moulding field prior to the present application (see

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Documents 3 and 4 cited in the international search report), and therefore the invention as described in Claim 5 merely involves the application of common practice before present application and art known prior to the present application within the design disclosed in Document 5, and therefore follows plainly and logically from the prior art, that is, it is something which does not involve the exercise of skill beyond that to be expected of a person skilled in the art.

4. The invention as described in Claims 6-10 is not disclosed in any of the documents cited in the international search report, and would not be obvious to a person skilled in the art.

Moreover, the invention as described in Claims 6-10 goes beyond the normal progress of technology having regard to the art known at the relevant date of these claims.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



<p>(51) 国際特許分類6 A46B 5/04</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/62370</p> <p>(43) 国際公開日 1999年12月9日(09.12.99)</p>												
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/02690</p> <p>(22) 国際出願日 1999年5月21日(21.05.99)</p> <p>(30) 優先権データ</p> <table border="0"> <tr> <td>特願平10/149041</td> <td>1998年5月29日(29.05.98)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平10/282689</td> <td>1998年10月5日(05.10.98)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平10/282690</td> <td>1998年10月5日(05.10.98)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平10/371607</td> <td>1998年12月25日(25.12.98)</td> <td>JP</td> </tr> </table> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 花王株式会社(KAO CORPORATION)[JP/JP] 〒103-0025 東京都中央区日本橋茅場町一丁目14番10号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ)</p> <p>大辻一也(OTSUJI, Kazuya)[JP/JP] 大川雅之(OKAWA, Masayuki)[JP/JP] 堤 泰樹(TSUTSUMI, Yasuki)[JP/JP] 山本 準(YAMAMOTO, Jun)[JP/JP] 菅井圭一郎(SUGAI, Keiichiro)[JP/JP] 熊本吉晃(KUMAMOTO, Yoshiaki)[JP/JP]</p>		特願平10/149041	1998年5月29日(29.05.98)	JP	特願平10/282689	1998年10月5日(05.10.98)	JP	特願平10/282690	1998年10月5日(05.10.98)	JP	特願平10/371607	1998年12月25日(25.12.98)	JP	<p>大谷憲一(OTANI, Kenichi)[JP/JP] 〒321-3426 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社 研究所内 Tochigi, (JP)</p> <p>浜田 薫(HAMADA, Kaoru)[JP/JP] 〒103-0025 東京都中央区日本橋茅場町一丁目14番10号 花王株式会社内 Tokyo, (JP)</p> <p>木寄日出郷(KIZAKI, Hidesato)[JP/JP] 〒131-0044 東京都墨田区文花2-1-3 花王株式会社 研究所内 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 羽鳥 修, 外(HATORI, Osamu et al.) 〒107-0052 東京都港区赤坂一丁目8番6号 赤坂HKNビル6階 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
特願平10/149041	1998年5月29日(29.05.98)	JP												
特願平10/282689	1998年10月5日(05.10.98)	JP												
特願平10/282690	1998年10月5日(05.10.98)	JP												
特願平10/371607	1998年12月25日(25.12.98)	JP												
<p>(54)Title: DISPOSABLE BRUSH</p> <p>(54)発明の名称 使い捨てブラシ</p> <div data-bbox="461 1327 1247 1772" data-label="Image"> </div> <p>(57) Abstract</p> <p>A disposable brush (1) having many projections (12) formed on a substrate (11) and on one surface (1s) of the substrate (11) by allowing portions of the substrate (11) to project, and formed of a non-woven fabric or pulp molding.</p>														

(57)要約

基板(11)及び該基板(11)の一面(1s)に該基板(11)の一部を突出させて形成した多数の突起(12)を有し、不織布又はパルプの成形体から形成されている使い捨てブラシ(1)。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサオ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノールウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		



## 明 細 書

使い捨てブラシ

## 技術分野

本発明は、製造が容易で、安価で実用性の高い使い捨てブラシに関する。

## 背景技術

紙や繊維を材料としたブラシとして、種々のものが提案されている（実開平 6－6 6 3 6 7 号公報，実開平 4－3 6 9 0 6 号公報，特開平 9－1 3 5 7 2 8 号公報，実開昭 6 2－6 9 9 1 0 号公報）。

実開平 6－6 6 3 6 7 号公報に記載のブラシは、ブラシの櫛部分を繊維で被覆したもので、製造が比較的困難であり、実開平 4－3 6 9 0 6 号公報に記載のブラシは、ブラシの櫛部分が超極細繊維からなる不織布で形成され、櫛部分以外は他の材料で形成されおり、構造が複雑で比較的高価なものであり、しかも、これらのブラシは使い捨てではない。実開昭 6 2－6 9 9 1 0 号公報に記載のブラシは、紙製の使い捨てブラシであるが、強度的に十分でなく実用性の低いものである。

また、これらのブラシでは、使用時における吸水性に関して全く考慮されていない。吸水性を有するブラシとしては、厚紙を櫛状に型抜きしたパルプ製の櫛が知られている。しかし、これは櫛であるから、面上に突起を多数有する構成のブラシと比べてブラッシング対象との接触面積が小さく、ブラッシング性に劣る。

## 発明の開示

従って、本発明の目的は、製造が容易で、安価で実用性の高い使い捨てブラシを提供することにある。

また、本発明の目的は、ブラッシング対象に拘わらず優れたブラシ機能を発揮し且つ高い吸水性を有する使い捨てブラシを提供することにある。

本発明は、基板及び該基板の一面に該基板の一部を突出させて形成した多数の突起を有し、不織布又はパルプの成形体から形成されている使い捨てブラシを提供することにより、上記目的を達成したものである。

## 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の使い捨てブラシの第 1 の実施形態を示す斜視図である。

図 2 は、第 1 の実施形態の使い捨てブラシの一部の突起を拡大して示す側面図である。

図 3 は、第 1 の実施形態の使い捨てブラシの一使用状態を示す斜視図である。

図 4 は、本発明の使い捨てブラシの第 2 の実施形態の一面側を示す平面図である。

図 5 は、図 3 に示す使い捨てブラシの使用状態を示す斜視図である。

図 6 は、第 2 の実施形態の他の例を示す平面図（図 4 相当図）である。

図 7 は、第 2 の実施形態の他の例を示す平面図（図 4 相当図）である。

図 8 は、本発明の使い捨てブラシの第 3 の実施形態の断面を拡大して示す図である。

図 9 は、第 3 の実施形態の使い捨てブラシの使用後の状態を示す、図 8 に対応する拡大断面図である。

図 10 は、本発明の使い捨てブラシの他の使用状態を示す斜視図（図 3 相当図）である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の使い捨てブラシの好ましい実施形態について図面を参照しながら説明する。図 1 は第 1 の実施形態の使い捨てブラシを示す斜視図、図 2 は第 1 の実施形態の使い捨てブラシの一部の突起を拡大して示す側面図、図 3 は第 1 の実施形態の使い捨てブラシの一使用状態を示す斜視図である。

本実施形態の使い捨てブラシ 1 は、図 1 に示すように、基板 11、及び該基板 11 の一面 1s に該基板 11 の一部を突出させて形成した多数の突起 12、12・・・からなり、一枚の不織布又はパルプの成形体から形成されている。

上記基板 11 は、平面視において、全体的に丸みを帯びた長方形形状の両長辺の中央外側に略半円状のフラップ 14、14 を延設した形状をしている。基板 11 の一面 1s には、各フラップ 14、14 と上記突起 12、12 との境界部分において、該フラップ 14、14 をそれぞれ、該面 1s の裏面側へ折り曲げ易くするための段差 16、16 が、上記長辺と略平行に形成されている。

上記突起 12、12・・・は、図 2 に示すように、上記基板 11 の一部を突出させることにより、上記基板 11 の表面 1s 上に、該基板 11 の長手方向に沿って等間隔に複数列設けられており、各列は、突起 12、12 同士が該基板 11 の短手方向で隣り合わせにならないように配置されている。上記突起 12、12・・・は、図 2 に示すように、それぞれ同じ大きさである山型形状をしている。ブラシ 1 が不織布から形成されている場合、突起 12 の内部は中空であり、またブラシ 1 がパルプの成形

体から形成されている場合、突起 1 2 の内部は中実になっている。

ブラシ 1 を形成する上記不織布としては、例えば、スパンレース不織布、スパンボンド不織布、サクシヨン不織布、ヒートボンド不織布、メルトブローン不織布、及びニードルパンチ不織布等が挙げられる。これらの不織布の坪量は、好ましくは  $50 \sim 500 \text{ g/m}^2$ 、更に好ましくは  $200 \sim 300 \text{ g/m}^2$  である。

上記不織布を形成する繊維としては、例えば、ポリエチレン (PE)、ポリプロピレン (PP)、ポリエチレンテレフタレート (PET)、ポリアミド (PA) の単独繊維若しくは 2 以上の混合繊維、及びこれらの繊維から形成された芯鞘構造複合繊維、サイドバイサイド構造等を有する複合繊維等が挙げられ、特に、突起の成形性及び高嵩高性等の点から芯鞘構造複合繊維が好ましい。上記不織布を形成する繊維の直径は、上記突起 1 2 に適度な圧縮強度を与える上で、 $1 \sim 100$  デニールが好ましい。

ブラシ 1 を形成するパルプの成形体に用いられるパルプとしては、針葉樹材、広葉樹材、草、イネ、葦等の天然繊維を単独又は混合したものが使用できる。上記繊維の繊維長は、ブラシに適度な強度を与える上で、 $0.2 \sim 40 \text{ mm}$  が好ましい。上記パルプとしては、板紙、再生紙等のシート状パルプやブロック状パルプ等、一般に市場に流通しているものを再利用できる。

上記パルプの成形体は、パルプを主体とした原材料組成物を所定の手段で成形して得られる。この原材料組成物には、該原材料組成物を成形体とするために、通常、繊維を固着させるための接着剤等が添加される。

上記接着剤としては、澱粉等の天然物系接着剤、酢酸ビニル樹脂等の合成樹脂系接着剤等を使用できる。上記接着剤の使用態様としては、パルプスラリーに接着剤を直接添加する方法の他、ブラシを接着剤溶液中

に含浸する方法等の通常の方法が採用でき、その使用量はパルプスラリーの固形分重量に対して、好ましくは2重量%以下、更に好ましくは、1重量%以下である。

ブラシの強度を向上させるためには、パルプ原料として、上記天然繊維にポリエチレン繊維等の合成繊維（バインダー繊維）を適宜混合したものをを用いることが好ましい。この場合、バインダー繊維としては、抄造成型において一般的に行われる乾燥プレス工程で熱融着（接着）性を示すものが好ましい。例えば、上記バインダー繊維としてポリエチレン繊維を使用した場合、その使用量は本実施形態のブラシ1の乾燥重量に対して、好ましくは、10～70重量%、更に好ましくは、30～50重量%である。また、ブラシの用途や要求性能に応じて、他の添加剤を適宜使用することができる。

本実施形態の使い捨てブラシ1は、上記フラップ14、14がマジックテープ（登録商標）2などを介して連結されており、図3に示すように、使用者の手に固定されて、上記突起12、12・・・が動物及びカーペット等の毛hに擦り付けられて使用される。尚、上記マジックテープ2は、その一端が、一方のフラップ14のみに固定されていても良い。

上記使い捨てブラシ1には、ブラッシング用等の各種薬液を含浸させることができる。薬液を含浸させた使い捨てブラシ1を用いると、肌、毛又は毛根に薬液を付与できるので、薬液の種類に応じて種々の薬液付与効果が得られる。薬液としては、例えば、育毛剤、染毛剤、殺菌剤、消臭剤、及びシャンプー等が挙げられる。

上記使い捨てブラシ1の突起12の内部が中空の場合には、該突起12の圧縮強度を向上させるために、別部材を充填することもできる。

本実施形態の使い捨てブラシ1において、上記突起12は、その先端部13から基部15方向への圧縮に対し、耐えられる最大圧縮荷重が好

ましくは1 N以上、更に好ましくは3～15 Nである。該突起12が1 N以上であると、ブラッシング中、突起が変形し、地肌への突起の到達感が少なくなることがなく好ましい。ここで、「突起の変形」とは、ブラシの使用中に突起が潰れ、弾性的に原形に復帰し難くなることを意味し、「地肌への突起の到達感」とは、例えば頭髮のブラッシングでは、突起が地肌に接触し、適度なマッサージ感が得られることをいう。

最大圧縮荷重の測定は、次の方法によった。

(株)オリエンテック製テンシロンRTM25において、最大荷重50 Nのロードセルを用いヘッドスピード100 mm/minの圧縮条件下で得られた荷重と変位の関係図の中で、測定開始後最初のピークをその突起の耐えられる最大圧縮荷重とした(n=10の平均値。それぞれ突起1個について測定。)

また、上記突起12は、髪が整えられる感覚や薬液の毛のつけ根又は皮膚までの到達性及び強度の点で、その高さHが好ましくは3～50 mm、更に好ましくは3～30 mm、一層好ましくは5～20 mm、最も好ましくは10～20 mmである。ここで、「髪が整えられる感覚」とは、梳かすことにより、適度な抵抗感を伴って髪が整えられる感覚をいう。

また、上記突起12は、その先端部13に好ましくは曲率半径R0.5～2.5 mm、更に好ましくは1～1.5 mmの曲面を有している。該曲率半径Rが、上記範囲であるとブラッシング中に頭髮の痛みを感じたり、強度不足となる虞がなく、また、地肌への突起の到達感、薬液の毛のつけ根又は皮膚までの到達性の点で好ましい。

また、上記突起12は、その剛性及び髪が整えられる感覚の点で、その基部15の直径Dが好ましくは3～20 mm、更に好ましくは5～15 mm、一層好ましくは7～12 mmである。

上記突起 12, 12・・・は、上記一面 1s において、好ましくは 2 ～ 40 個 /  $10\text{ cm}^2$  の密度、更に好ましくは 3 ～ 20 個 /  $10\text{ cm}^2$  の密度で形成されている。各突起 12, 12 間の間隔 P は、該突起 12 の大きさ及び該密度により自ずと規定されるが、好ましくは 5 ～ 22 mm であり、更に好ましくは 10 ～ 18 mm である。上記突起 12 の密度が、上記範囲であると、毛を梳く感覚、薬液の各毛のつけ根及び皮膚までの到達性、並びに所定の突起高さの形成の点で好ましい。

本実施形態の使い捨てブラシ 1 は、不織布又はパルプの成形体から形成されるため、製造が容易で安価であり、使い捨てであるから、衛生的である。特に、ブラシ 1 がパルプの成形体から形成されている場合には高い吸水性を有する。

また、本実施形態の使い捨てブラシ 1 によれば、上記突起 12 が、不織布又はパルプの成形体からなっているとしても十分な強度を有し且つブラッシング対象との十分な接触面積を有するため、効率良くブラッシングできる。

また、本実施形態の使い捨てブラシ 1 は、不織布又はパルプの成形体からなるため、犬、猫等の毛におおわれた動物、頭髮、カーペット、毛皮製品のブラッシング及び処理に好適である。

また、本実施形態のブラシ 1 は突起の高さをブラシの用途に応じて任意に設計することができるので、頭髮や皮革製品等の通常のブラッシング対象のみならず、ある種の犬や猫のように全身が厚く毛に覆われているようなものに対しても優れたブラシ機能を発揮できる。

本実施形態の使い捨てブラシ 1 は、例えば、下記の如き製造方法により製造される。

ブラシ 1 が不織布から形成されている場合、まず、繊維をカットした後、カード機でウェブを形成し、更にヒートロールを通して不織布を製

造する。

次に、得られた不織布を適当な幅にスリットした後、雌雄金型を用いてこの不織布をプレスすることにより一個の使い捨てブラシ分の上記突起 12, 12・・・及び上記段差 16, 16 に相当する部分を該不織布上に複数形成する。また金型の温度は 120～200℃、プレス圧は 0.5～20 kgf/cm<sup>2</sup>、プレス時間は 3～15 秒が、それぞれ好ましい。

次に、プレス処理された上記不織布を、使い捨てブラシ 1 個分の上記突起 12, 12・・・及び上記段差 16, 16 が本実施形態の如く内部に位置して形成されるように、上記基板 11 の平面視形状にカットして、本実施形態の使い捨てブラシ 1 を得る。

ブラシ 1 がパルプの成形体から形成される場合、ブラシ 1 は、好ましくは、パルプモールド法により製造される。まず、原料となる板紙等のパルプシートを水に溶解してスラリーとする。スラリーはこのまま用いることができるが、ブラシに適度な強度を与える上で、叩解することが好ましい。この場合、叩解後のパルプの濾水度は、好ましくは 300～800 ml、更に好ましくは 400～700 ml である。尚、接着剤等を使用する場合、叩解後にスラリーに添加する。

次に、得られた上記スラリーから本実施形態のパルプ製ブラシ 1 の形状の抄紙型に抄紙成分を抄きとると共に該抄紙成分を脱水成形し、次いで、抄紙型の型通りに抄きとられた該抄紙成分を雌雄一對のプレス型でプレスして乾燥プレス加工を施して、本実施形態のブラシ 1 を得る。

次に、本発明の使い捨てブラシの第 2 及び第 3 の実施形態について、図 4～図 10 を参照しながら説明する。尚、第 2 及び第 3 の実施形態において特に説明しない点については、第 1 の実施形態について詳述した説明が適宜適用される。また、図 4～図 10 において、図 1～図 3 と同



じ部材には同じ符号が付してある。

図 4 に示す第 2 の実施形態の使い捨てブラシ 1 においては、不織布からなる基板 1 1 の周側部 2 4 に切り込み 2 1 が設けられており、切り込み 2 1 を介してブラシ 1 が把持可能となされている。

基板 1 1 は縦長形状であり、切り込み 2 1 は、基板 1 1 の長手方向両端縁側に位置する周側部 2 4 a、2 4 b の両方に、スリット状に設けられている。このように、本実施形態の使い捨てブラシ 1 は、縦長の基板 1 1 の周縁部を余して突起 1 2 を形成してある。

また、一端部 2 5 a 側の周側部 2 4 a における切り込み 2 1 a は、基板 1 1 の端縁形状に沿った湾曲形状で基板 1 1 の幅全域に亘る長さで設けられており、他端部 2 5 b 側の周側部 2 4 b における切り込み 2 1 b も同様の湾曲形状で、周側部 2 4 a における切り込み 2 1 a よりも短く形成されている。このように、切り込み 2 1 は、ブラシ 1 の両端部に設けられているのが好ましく、一方の切り込み 2 1 a と他方の切り込み 2 1 b との長さの比は、一方の切り込み 2 1 a : 他方の切り込み 2 1 b = 1 : 0.4 ~ 0.8 とするのが好ましい。

本実施形態の使い捨てブラシ 1 は、図 5 に示すように、切り込み 2 1 a、2 1 b により自由な帯状部材となされた両端縁部 2 5 a、2 5 b を他面 1 s' 側に持ち上げて、切り込み 2 1 a、2 1 b による開口 2 2 a、2 2 b を形成し、形成された開口 2 2 a 側から手（指）を入れて、手により把持して、通常のブラシと同様に用いることができる。尚、左右いずれの手であるかを問わずに用いることができ、また、保持用の道具等により把持することもできる。このように使用できるため、持ちやすく、使いやすい。特に、本実施形態の如く、1 枚の不織布によりブラシ 1 が形成されている場合には、使いやすさがより向上する。

図 6 に示す実施形態の使い捨てブラシ 1 は、他端部 2 5 b 側において、

長さの短い切り込み 2 1 b' , 2 1 b' が、左右に 2 つ設けられている。使用時には、この切り込み 2 1 b' , 2 1 b' に指を入れて使用する。

図 7 に示す実施形態の使い捨てブラシ 1 は、上記切り込みが、十字状に設けられている。詳細には、切り込み 2 1 c , 2 1 d , 2 1 e が、それぞれ、突起の形成されていない領域としての周側部 2 4 に形成されている。そして、使用時には、この切り込み 2 1 c , 2 1 d , 2 1 e に指を入れて（本実施形態のブラシは、右手用であり、2 1 c には親指を、2 1 d には人差し指を、2 1 e には薬指を入れて使用するのが好ましい）把持して、使用に供する。

上述した第 2 の実施形態においては、切り込みが、長手方向両端部に形成されたものを例示して説明したが、どちらか一方のみとしても良く、また、側方の周側部に形成しても良い。また、ブラシの形成材料も、不織布に限定されず、パルプでもよい。

第 3 の実施形態の使い捨てブラシ 1 は、不織布から形成されており、図 8 に示すように、基板 1 1 の裏面側に保水材 3 2 が配され、該保水材 3 2 の外表面をシートカバー 3 3 が被覆している。上記保水材 3 2 はパルプ 4 1 と吸水ポリマー 4 2 からなっており、該パルプ 4 1 は上記基板 1 1 の裏面に接して配され、該吸水ポリマー 4 2 は該パルプ 4 1 と上記シートカバー 3 3 との間に配されている。

上記保水材 3 2 は、図 8 に示すように、上記各突起 1 2 の内側にそれぞれ埋め込まれた状態で基板 1 1 の裏面に配されており、その外表面は上記シートカバー 3 3 によって被覆されており、該シートカバー 3 3 の周辺部は、上記フラップ 1 4 の裏面に接着剤等により固定されている。上記保水材 3 2 を構成する上記パルプ 4 1 は上記基板 1 1 の裏面に接して配され、上記吸水ポリマー 4 2 は該パルプ 4 1 と上記シートカバー 3

３との間に配されている。

上記パルプ４１は、上記突起１２の内側に埋め込まれた量も含めて、上記基板１１の裏面に好ましくは $0.02 \sim 0.6 \text{ g/cm}^2$ 、更に好ましくは $0.1 \sim 0.3 \text{ g/cm}^2$ の坪量で配されている。また、上記パルプ４１は、好ましくは、 $0.01 \sim 0.12 \text{ g/cm}^3$ 、更に好ましくは $0.05 \sim 0.6 \text{ g/cm}^3$ の充填密度で配されている。また、上記吸水ポリマー４２は、上記シートカバー３３の内側に好ましくは $0.002 \sim 0.04 \text{ g/cm}^2$ 、更に好ましくは $0.004 \sim 0.01 \text{ g/cm}^2$ の坪量で配されている。

上記保水材３２としては、パルプ、吸水ポリマー、粘土等が挙げられる。上記パルプ４１及び上記吸水ポリマー４２としては、使い捨ておむつや使い捨て生理用ナプキンの吸収体に使用されるものが特に制限なく用いられる。

上記シートカバー３３は、上記基板１１の裏面の空所に配された上記保水材３２を被覆保持するもので、該シートカバー３３としては、PE、PP、ポリ塩化ビニール等が好ましい。

本実施形態のブラシ１を得るには、基板１１の裏面を上方に向けて、該裏面の空所に所定量のパルプ４１を埋め、その上面に所定量の吸水ポリマー４２を配し、その上面をシートカバー３３で被覆し、該シートカバー３３の周辺部をブラシ１におけるフラップ１４の裏面に接着剤等で固着すればよい。

本実施形態のブラシ１によれば、その使用時に次のような作用効果が奏される。本実施形態のブラシ１を手で保持し、上記突起１２、１２・・が頭皮に当たるようにして、例えば濡れた頭髪を梳かすと、水分は該突起１２、１２・・を通過して、先ずパルプ４１に速やかに吸収され、パルプ４１に吸収された水分は、更に、パルプ４１に接して配されてい

る吸水能の高い吸水ポリマー 4 2 に吸収される。その結果、上記パルプ 4 1 は水分吸収能に余力を生じ、突起 1 2 , 1 2 ・ ・ を介して、再び水分を吸収する。このような作用は、上記吸水ポリマー 4 2 の水分吸収能の限界に近づくまで繰り返され、上記保水材 3 2 の吸水量が増えてくると、上記吸水ポリマー 4 2 が膨潤して、上記ブラシ 1 は図 9 に示す状態となる。このような状態下において、保水材 3 2 はシートカバー 3 3 により被覆保持されているため、水分を吸収保持した上記保水材 3 2 がブラシ 1 の使用に支障を来すことはない。

本実施形態のブラシ 1 は、ブラシ機能に加えて、吸水性のみならず、ブラシに保持している水分等を徐々に乾燥している対向物へ移行させる徐放性も具備するので、各種薬液を該不織布ブラシの保水材 3 2 に含浸させて用いれば、スキンケアブラシ、ドライシャンプーブラシ、染毛ブラシ、育毛ブラシ、頭皮ケアブラシ等としても効果的に用いられる。

本実施形態における保水材 3 2 の種類、使用量は、用途に応じて適宜変更し得る。また、ブラシ 1 の形状並びに保水材 3 2 の種類及び配置形態によっては、シートカバー 3 3 を省略することもできるし、シートカバー 3 3 の固定方法及びそれ自体も適宜変更できる。

本実施形態のブラシ 1 は、ブラッシング機能に加え、高い吸水性及び徐放性を有するもので、そのため、犬、猫等のペットや、カーペット、毛皮製品等用の及び人の髪用の速乾ブラシとして好適に使用できる他、各種薬液を含浸させれば、薬液付与効果を奏するブラッシングが可能となる。

本発明の使い捨てブラシは、上記の各実施形態に制限されず、本発明の趣旨を逸脱しない範囲で種々の変更が可能である。

例えば、上記実施形態においては、上記基板 1 1 のサイズを、使用者の手の平サイズとしているが、用途に応じて適宜変更し得る。

また、上記突起 12, 12・・・は、上記基板 11 の面 1s 上に等間隔で配列されているが、ランダムな配列を含めて種々の配列とすることもできる。

また、上記突起 12, 12・・・それぞれの形状及びサイズを同じものとしたが、山形状以外に、鋸刃状や角錐台状等としても良く、各突起のサイズを異ならせても良い。

また上記実施形態のブラシ 1 においては、図 3 に示すマジックテープを用いず、図 10 に示すように、基板 11 の裏面上に、基板 11 の長辺方向と平行に手を当て、親指と小指をそれぞれ該長辺中央部の上記フラップ 14, 14 の上記表面 1s 側に添えて、該フラップ 14, 14 を裏面側に折り曲げるようにして使用しても良い。

また、本発明の使い捨てブラシは、上述の製造方法以外の製造方法でも製造可能である。

また、上記の各実施形態は、適宜相互に置換可能である。

## 実施例

本発明の使い捨てブラシの実施例を下記表 1 に示す。

表 1

		実 施 例		
		1	2	3
最大圧縮荷重 (N)		1 0	1 5	5
突起高さ (mm)		1 0	2 0	1 0
先端曲率半径 (mm)		1	1	1. 5
突起ピッチ (mm)		1 6	1 6	2 2
突起基部の直径 (mm)		1 2	1 2	1 2
不織布の坪量 (g / m <sup>2</sup> )		2 5 0	3 5 0	2 5 0
評価	髪が整えられる感覚	○	○	×
	皮膚への到達感	◎	◎	○
	使用中の突起の変形	◎	○	○

上記実施例 1 ～ 3 のブラシは、全て芯部がポリエチレンテレフタレート (P E T)、鞘部がポリエチレンテレフタレート及びポリプロピレンの混合物からなる芯鞘構造の複合繊維不織布を、適宜な大きさにカットし、それぞれ雌雄金型を用いて金型温度 1 2 0 ～ 2 0 0℃、プレス圧 0 . 5 ～ 2 0 k g f / c m<sup>2</sup>、プレス時間 3 ～ 1 5 秒で成形したものである。

表 1 における各実施例の評価は、次の方法によった。

〔髪が整えられる感覚、突起の皮膚への到達感及び使用中の突起の変形の評価方法〕

被験者 1 0 人にそれぞれ実施例 1 ～ 3 の使い捨てブラシを用いて自分

の頭髮をブラッシングさせ、それぞれ、良くない（＝１ポイント）、やや良くない（＝２ポイント）、やや良い（＝３ポイント）、良い（＝４ポイント）とし、次に、これらのポイントを集計し、４～１２ポイントを×、１３～２１ポイントを△、２２～３０ポイント以上を◎とした。

本発明の使い捨てブラシの別の実施例を下記表２に示す。

表 ２

		実 施 例		
		４	５	６
最大圧縮荷重（N）		４．２	８．３	１０．７
先端曲率半径（mm）		１．５	１．５	２
突起高さ（mm）		１１	１５	２０
突起ピッチ（mm）		１０	１４	１７
突起基部の直径（mm）		４	７	１０
ブラシの密度（g/cm <sup>3</sup> ）		０．１	０．１２	０．１５
評価	髪が整えられる感覚	◎	◎	○
	皮膚への到達感	○	◎	◎
	使用中の突起の変形	○	○	○

上記実施例４～６のブラシは、パルプモールド法により次のようにして製造された。パルプ原料としてケミカルパルプを用いて濾水度４５０mlのパルプを調製し、該スラリー状のパルプに接着剤として、ポリアミドアミンエピクロルヒドリン樹脂を該パルプスラリーの固形分重量に対して０．１重量％添加し、これからそれぞれの形状の型に該スラリーの抄紙成分を抄きとると共に該抄紙成分を脱水成形し、次いで、抄紙型

の型通りに抄きとられた該抄紙成分を雌雄一対のプレス型を用いてプレス型温度70～120℃、プレス圧2～10kgf/cm<sup>2</sup>、プレス時間30～120分でプレスして乾燥プレス加工を施して得た。

#### 産業上の利用可能性

本発明の使い捨てブラシは、製造が容易で、安価、衛生的であり、実用性の高いものである。

また、本発明のブラシは、その表面に十分な強度と高さを持つ突起を多数有しているため、犬、猫等の毛に覆われた動物、頭髮、カーペット、毛皮製品等のブラッシングに好適であり、特にブラッシング対象が厚く毛に覆われている場合にも好適に使用できる。また、本発明ののブラシがパルプの成形体から形成されている場合には、高い吸水性を有するものであるから、速乾ブラシとして好適に使用できる他、各種薬液を含浸させれば、薬液付与効果を奏するブラッシングが可能となる。

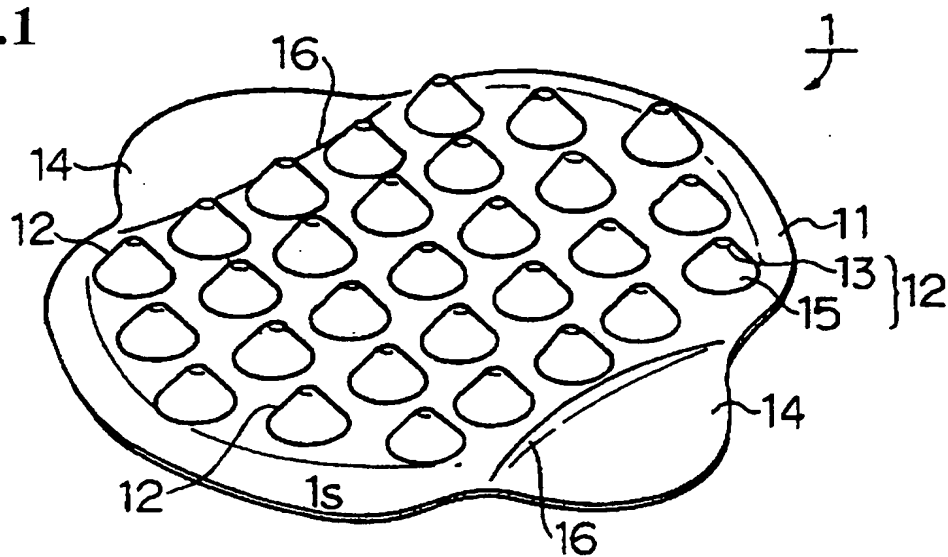


## 請 求 の 範 囲

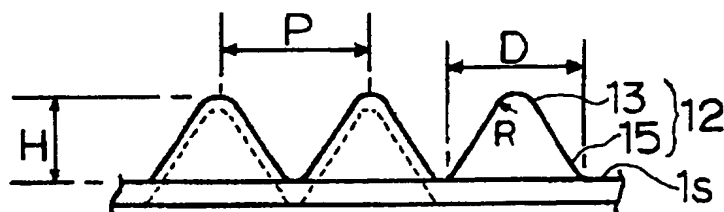
1. 基板及び該基板の一面に該基板の一部を突出させて形成した多数の突起を有し、不織布又はパルプの成形体から形成されている使い捨てブラシ。
2. 上記突起は、その先端部から基部方向への圧縮に対し、耐えられる最大圧縮荷重が1 N以上であることを特徴とする請求の範囲第1項記載の使い捨てブラシ。
3. 上記突起は、その高さが3 ~ 30 mmであることを特徴とする請求の範囲第1項記載の使い捨てブラシ。
4. 上記突起は、その先端部に曲率半径0.5 ~ 2.5 mmの曲面を有していることを特徴とする請求の範囲第1項記載の使い捨てブラシ。
5. 上記成形体が、パルプモールド法により成形された成形体であることを特徴とする請求の範囲第1項記載の使い捨てブラシ。
6. 上記基板がシート状の基板からなり、該基板の周側部に切り込みが設けられており、該切り込みを介して把持可能となされていることを特徴とする請求の範囲第1項記載の使い捨てブラシ。
7. 上記基板は縦長形状であり、上記切り込みは、該基板の長手方向端縁側に位置する周側部の両方に、該基板の幅方向に向けてスリット状に設けられていることを特徴とする請求の範囲第6項記載の使い捨てブラシ。
8. 上記切り込みは、十字状に3カ所設けられていることを特徴とする請求の範囲第6項記載の使い捨てブラシ。
9. 上記基板の裏面側に保水材を配したことを特徴とする請求の範囲第1項記載の使い捨てブラシ。
10. 上記保水材が、パルプと吸水ポリマーとからなり、該保水材の外

表面が、シートカバーによって被覆されていることを特徴とする請求の  
範囲第 9 項記載の使い捨てブラシ。

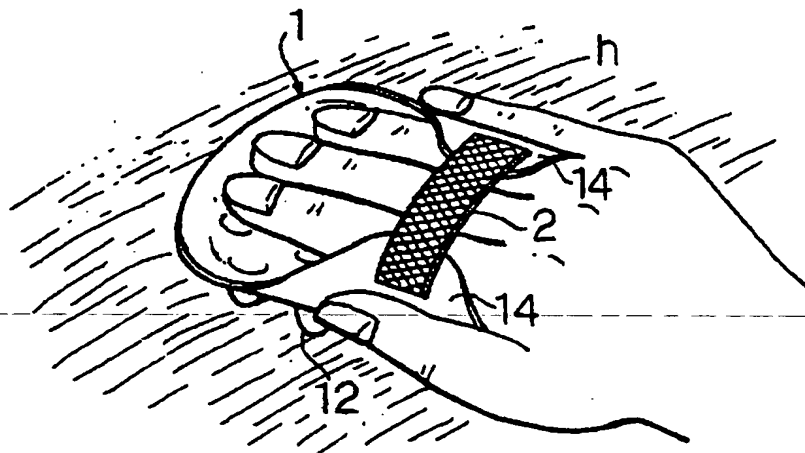
**Fig.1**



**Fig.2**

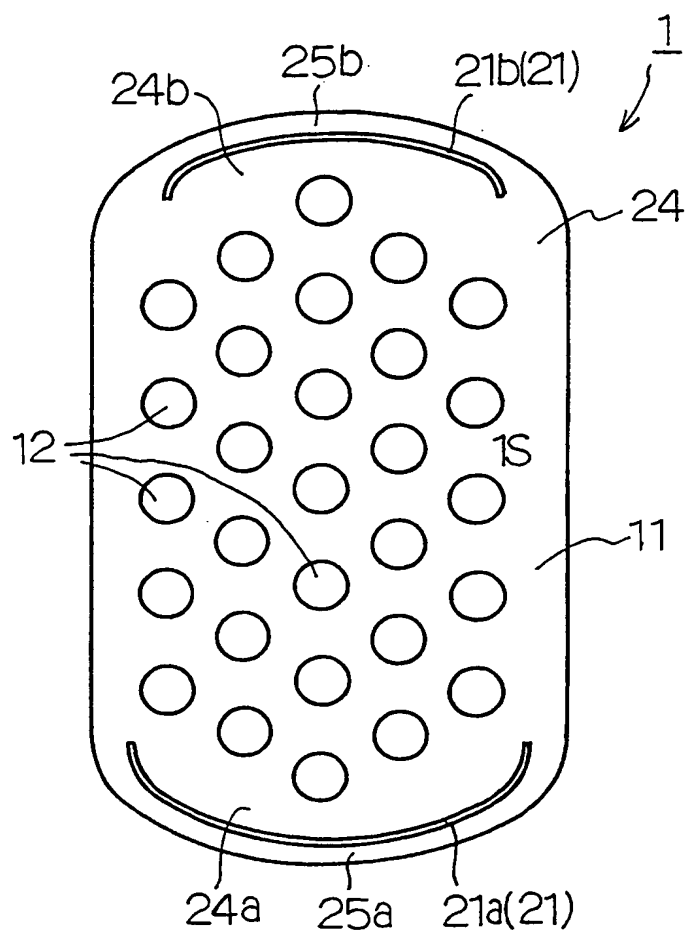


**Fig.3**

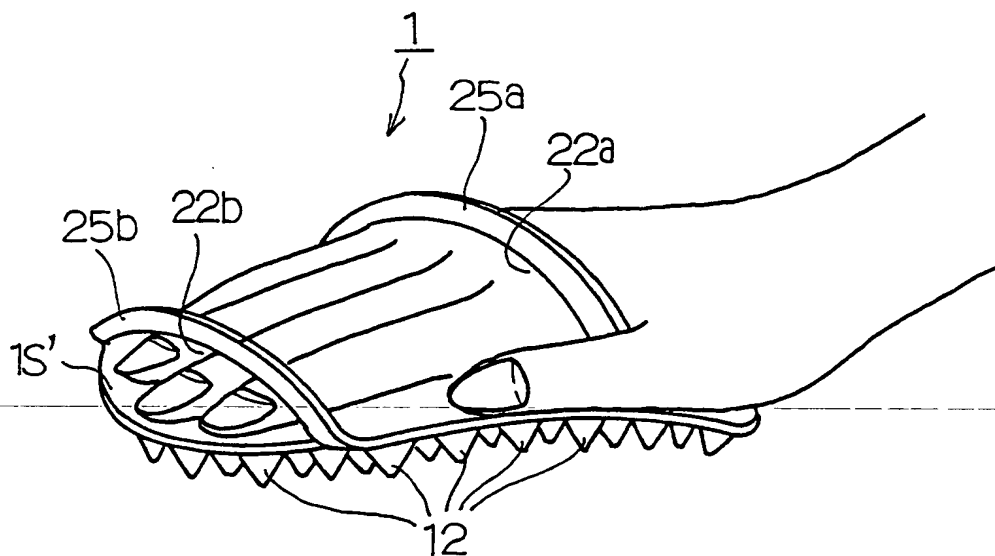




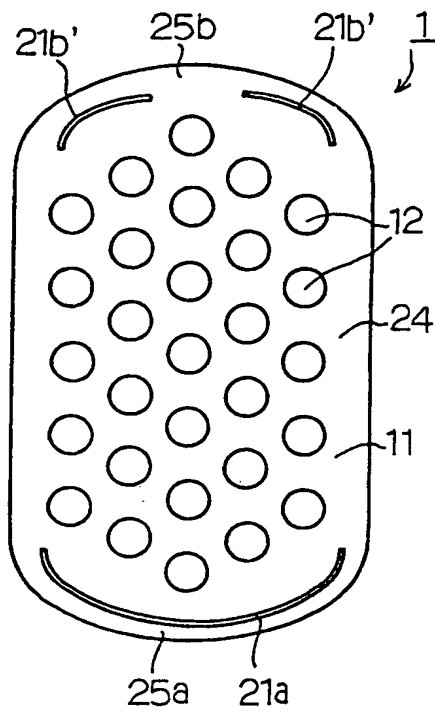
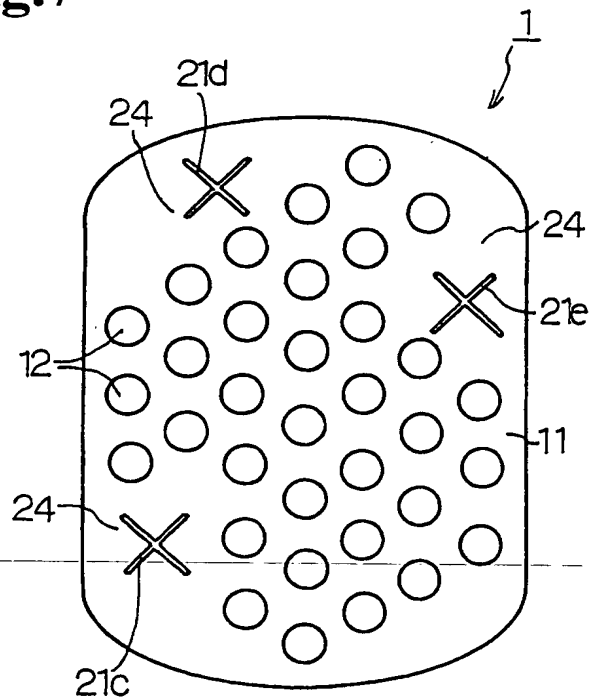
**Fig.4**



**Fig.5**



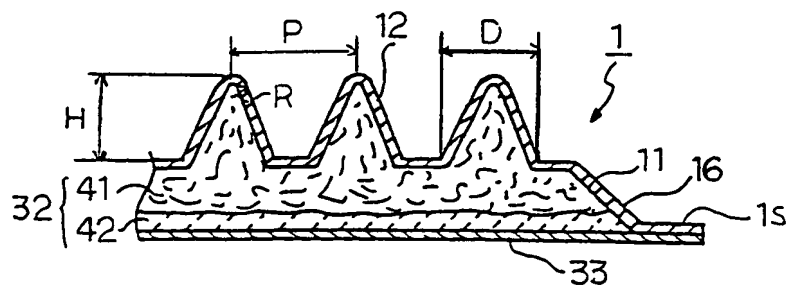


**Fig.6****Fig.7**

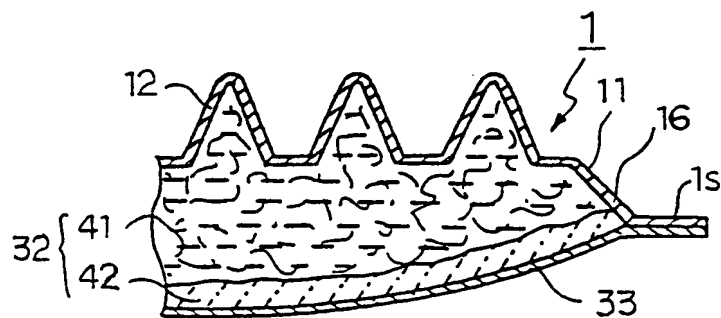




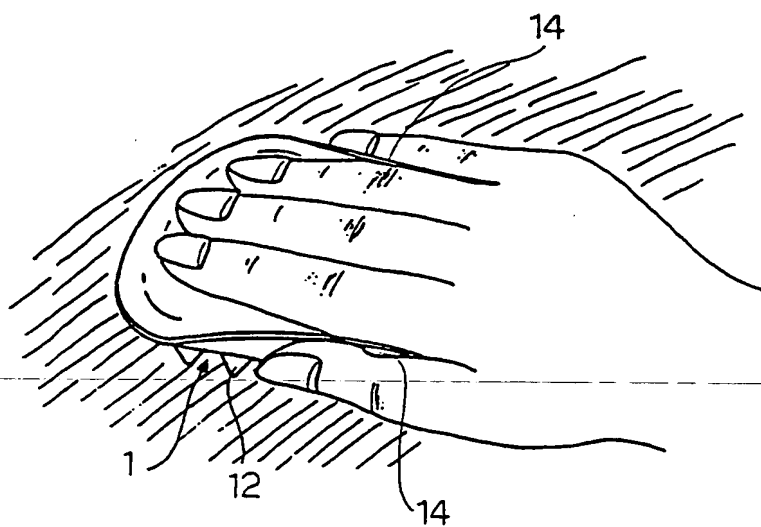
**Fig.8**



**Fig.9**



**Fig.10**





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02690

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> A46B5/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> A46B1/00-17/08, A46D1/00-9/06, A45D19/00-20/52,  
B29C45/00-45/24, B29C45/46-45/63, B29C45/70-45/72,

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1926-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1999  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1999

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 10-085044, A (Kenzo Kato), 7 April, 1998 (07. 04. 98) (Family: none)	1, 5
Y	JP, 62-69910, U (Tadashi Tomikura), 2 May, 1987 (02. 05. 87) (Family: none)	1, 5
Y	JP, 8-27700, A (Sony Corp.), 30 January, 1996 (30. 01. 96) (Family: none)	5
Y	JP, 6-278160, A (Nakayama Kogyo Co., Ltd.), 4 October, 1994 (04. 10. 94) (Family: none)	5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
7 June, 1999 (07. 06. 99)

Date of mailing of the international search report  
15 June, 1999 (15. 06. 99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02690

B. (Continuation) FIELDS SEARCHED

B29C45/74-45/84, B65D57/00-59/08, B65D81/00-81/16

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/02690

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl.<sup>°</sup> A46B5/04

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>°</sup> A46B 1/00-17/08, A46D 1/00-9/06,  
A45D19/00-20/52, B29C45/00-45/24,  
B29C45/46-45/63, B29C45/70-45/72,

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1996年  
日本国公開実用新案公報 1971-1999年  
日本国登録実用新案公報 1994-1999年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P, 10-085044, A (加藤憲三) 7. 4月. 1998 (07. 04. 98) (ファミリーなし)	1, 5
Y	J P, 62-69910, U (富倉正) 2. 5月. 1987 (0 2. 05. 87) (ファミリーなし)	1, 5
Y	J P, 8-27700, A (ソニー株式会社) 30. 1月. 199 6 (30. 01. 96) (ファミリーなし)	5
Y	J P, 6-278160, A (中山工業株式会社) 4. 10月. 1 994 (04. 10. 94) (ファミリーなし)	5

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日  
06. 07. 99国際調査報告の発送日  
15.06.99

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
種子 浩明 印

3 R 9028

電話番号 03-3581-1101 内線 3346

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

B29C45/74-45/84, B65D57/00-59/08,  
B65D81/00-81/16

# Temperature-Responsive Liquid Chromatography. 2. Effects of Hydrophobic Groups in N-Isopropylacrylamide Copolymer-Modified Silica

Hidaki Kanazawa, Yuki Kashiwase, Kazuo Yamamoto, and Yoshikazu Matsushima

Kyoritsu College of Pharmacy, 1-5-30 Shiba-koen, Minato, Tokyo 105, Japan

Akihiko Kikuchi, Yasuhisa Sakurai, and Teruo Okano\*

Institute of Biomedical Engineering, Tokyo Women's Medical College, 8-1 Kawadacho, Shinjuku, Tokyo 162, Japan

We recently reported the new concept of temperature-responsive liquid chromatography using temperature-responsive poly(*N*-isopropylacrylamide)-modified surfaces as high-performance liquid chromatography media with aqueous mobile phases. Incorporation of hydrophobic sites is an important factor to improve the efficacy (selectivity and retention) of temperature-responsive chromatography. Toward this goal, we have synthesized semitelechelic copolymers of *N*-isopropylacrylamide (IPAAm) and butyl methacrylate (BMA) having reactive terminal functional groups using telomerization. The lower critical solution temperatures of the copolymers shift to lower temperatures with increasing hydrophobic BMA content in the poly(IPAAm-co-BMA) relative to that of the IPAAm homopolymer. This temperature-responsive semitelechelic copolymer was grafted to the surface of (aminopropyl)silica through the reaction of activated ester-amine coupling. The polymer-modified silica was used as a column packing material. Separation of a mixture of five steroids having various hydrophobicities was investigated. Retention of steroids on poly(IPAAm-co-BMA)-modified columns is increased with an increase in column temperature. The capacity factors for steroids on the copolymer-modified silica beads was much larger than that on homopolymer PIPAAm-modified columns. The capacity factor for testosterone at 50 °C was 33.8 for poly(IPAAm-co-BMA) containing 5 mol % BMA, while that for the PIPAAm homopolymer was 15.0 at the same temperature. The influence of column temperature on steroid retention behavior on copolymer-modified stationary phases was significant compared with the case of homopolymer-modified columns. Furthermore, retention times for steroids increased remarkably with increasing BMA composition. The temperature-responsive elution behavior for the steroids was strongly affected by the hydrophobicity of the grafted polymer chains on silica surfaces. Possible protein separation in temperature-responsive liquid chromatography was explored using insulin chains A and B, and  $\beta$ -endorphin fragment 1-27. On IBC-3.2-modified silica column, these three peptides were successfully separated at 30 °C with 0.5 M NaCl aqueous solution (pH 2.1) as mobile phase. The retention times of these peptides were related to the number

of hydrophobic amino acid residues in the peptides. In the proposed chromatography system, elution of target substances is controlled only by a small change in column temperature without any further modification of the aqueous mobile phase.

Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PIPAAm) exhibits thermally reversible soluble-insoluble changes in response to temperature changes across a lower critical solution temperature (LCST) at 32 °C in aqueous solution.<sup>1</sup> Polymer chains of IPAAm show an expanded conformation in water below the LCST due to strong hydration and change to compact forms above the LCST by sudden dehydration. PIPAAm hydrogels have been utilized for drug delivery systems,<sup>2-4</sup> and cell culture substrata.<sup>5-7</sup> PIPAAm has also been utilized in thermoresponsive bioconjugates,<sup>8-13</sup> which can be applied in reversible bioreactor systems. Porous glass-based<sup>14</sup> and polymer-based<sup>15,16</sup> column packing materials modified with PIPAAm have been used for temperature-dependent pore size control in size exclusion chromatography, but only slight changes in solute retention were observed on these columns.

- (1) Heskins, M.; Guillet, J. E.; James, E. J. *Macromol. Sci. Chem. A* 1968, 2, 1441-1445.
- (2) Bae, Y. H.; Okano, T.; Kim, S. W. *J. Polym. Sci. Polym. Phys.* 1990, 28, 923-936.
- (3) Yoshida, R.; Sakai, K.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Bae, Y. H.; Kim, S. W. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1991, 3, 155-162.
- (4) Yoshida, R.; Sakai, K.; Okano, T.; Sakurai, Y. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1991, 3, 243-252.
- (5) Yamada, N.; Okano, T.; Sakai, H.; Karikusa, F.; Sawasaki, Y.; Sakurai, Y. *Makromol. Chem., Rapid Commun.* 1990, 11, 571-576.
- (6) Okano, T.; Yamada, N.; Sakai, H.; Sakurai, Y. *J. Biomed. Mater. Res.* 1993, 27, 1243-1251.
- (7) Okano, T.; Yamada, N.; Okuhara, M.; Sakai, H.; Sakurai, Y. *Biomaterials* 1995, 16, 297-303.
- (8) Chen, G.; Hoffman, A. S. *Bioconjugate Chem.* 1993, 4, 509-514.
- (9) Chilkoti, A.; Chen, G.; Stayton, P. S.; Hoffman, A. S. *Bioconjugate Chem.* 1994, 5, 504-507.
- (10) Chen, G.; Hoffman, A. S. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1994, 5, 371-382.
- (11) Stayton, P. S.; Shimoboji, T.; Long, C.; Chilkoti, A.; Chen, G.; Harris, J. M.; Hoffman, A. S. *Nature* 1995, 378, 472-474.
- (12) Matsukata, M.; Takei, Y.; Aoki, T.; Sanui, K.; Ogata, N.; Sakurai, Y.; Okano, T. *J. Biochem.* 1994, 116, 682-686.
- (13) Matsukata, M.; Aoki, T.; Sanui, K.; Ogata, N.; Kikuchi, A.; Sakurai, Y.; Okano, T. *Bioconjugate Chem.* 1996, 7, 96-101.
- (14) Gewehr, M.; Nakamura, K.; Ise, N.; Kitano, H. *Makromol. Chem.* 1992, 193, 249-256.
- (15) Hosoya, K.; Sawada, E.; Kimata, K.; Araki, T.; Tanaka, N.; Fréchet, J. M. J. *Macromolecules* 1994, 27, 3973-3976.
- (16) Hosoya, K.; Kimata, K.; Araki, T.; Tanaka, N.; Fréchet, J. M. J. *Anal. Chem.* 1995, 67, 1907-1911.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



We previously demonstrated that reversible temperature-sensitive surface wettability changes can be achieved on PIPAAm terminally grafted surfaces using rapid changes in grafted polymer conformation.<sup>17</sup> PIPAAm-grafted surfaces are hydrophilic at lower temperatures; as temperature increases, sudden and dramatic water contact angle increases are observed, indicating increasingly hydrophobic surface properties. Temperature-responsive surface property changes for terminally grafted polymer surfaces were more rapid and significant than that seen for multipoint-grafted PIPAAm surfaces.<sup>17</sup> These differences were related to differences in conformational restrictions in PIPAAm graft chains<sup>13,17,18</sup> grafted by different methods that influence polymer dehydration dynamics.

Recently, we proposed a new concept of temperature-responsive liquid chromatography using PIPAAm-modified silica as a column packing material.<sup>19</sup> This system would be highly useful to control the function and properties of the stationary phase for HPLC by changing aqueous mobile phase temperature. An important feature is that hydrophilic-hydrophobic property changes for the stationary phase surfaces respond to external temperature changes. Therefore, solute interactions with the stationary phase surface can be altered by changing temperature of the aqueous mobile phase. The driving force for retention in this system should be hydrophobic interactions between solute molecules and grafted polymer chains on the stationary phase surface.

To enhance the selectivity and retention in temperature-responsive liquid chromatography, it would be desirable to modulate wide ranges of hydrophilicity and hydrophobicity of stimuli-responsive stationary phase using temperature. In particular, it may be effective to introduce hydrophobic sites into the hydrophilic PIPAAm chains to improve the efficacy of the temperature-responsive liquid chromatography system. Generally, the PIPAAm LCST decreases with increasing polymer hydrophobicity,<sup>20</sup> which enhances the dehydration of polymer chains in aqueous media. To realize this experimentally, carboxyl semitelechelic copolymers of IPAAm with butyl methacrylate (BMA) as a hydrophobic comonomer were synthesized by radical telomerization using 3-mercaptopropionic acid as telogen.<sup>21</sup> We also reported that the LCST values in PIPAAm copolymers bearing carboxyl end groups is controllable over the range of 25–45 °C with hydrophilic and hydrophobic comonomers.<sup>21</sup> It is difficult to control hydrophobic interactions between PIPAAm and hydrophobic solutes below the PIPAAm LCST. However, IPAAm copolymers with BMA increase the aggregation forces of PIPAAm chains at the LCST. This increased aggregation force for poly(IPAAm-co-BMA) suggests the possibility of modulating hydrophobic interaction of polymer grafted on silica with eluents even below the polymer LCST.

In the present paper, we prepared poly(IPAAm-co-BMA)-modified silica as column packing materials to modulate hydrophobic interaction of hydrophobic steroids with polymer-modified

stationary phases even at lower temperature. In this paper, we succeeded in enhancing the separation efficacy of hydrophobic substances using temperature-responsive liquid chromatography over a wide temperature range (5–50 °C). Possible application of this temperature-responsive liquid chromatography systems was explored for peptide separation using aqueous mobile phase.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Materials.** All procedures for reagent purification and polymer syntheses were performed in a ventilated draft chamber to avoid inhaling toxic materials.

*N*-Isopropylacrylamide (IPAAm; Kodak, Rochester, NY) was purified by recrystallization from a toluene-hexane mixture and dried at room temperature in vacuo. BMA obtained from Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan) was distilled under reduced pressure and the fraction boiling at 61 °C (5 mmHg) was used. 3-Mercaptopropionic acid (MPA; Wako Pure Chemicals) was distilled under reduced pressure and the fraction boiling at 95 °C (5 mmHg) was used. 2,2'-Azobisisobutyronitrile (AIBN), *N,N*-dimethylformamide (DMF), ethyl acetate (EtOAc), and dioxane were obtained from Wako Pure Chemicals and purified by conventional methods. *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and *N*-hydroxysuccinimide (SuOH) were purchased from Wako Pure Chemicals. (Aminopropyl)silica (averaged diameter of 5  $\mu$ m, pore size 120 Å) was purchased from Nishio Kogyo (Tokyo, Japan). Sulfosuccinimidyl-4-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)butyrate (*s*-SDTB) was obtained from Pierce (Rockford, IL). Hydrocortisone and hydrocortisone acetate were purchased from Wako Pure Chemicals. Prednisolone, dexamethasone, testosterone, bovine insulin chain A (oxidized) (Gly-Ile-Val-Glu-Gln-CysSO<sub>3</sub>-CysSO<sub>3</sub>-Ala-Ser-Val-CysSO<sub>3</sub>-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-CysSO<sub>3</sub>-Asn), human  $\beta$ -endorphin fragment 1–27 (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr), and bovine insulin chain B (oxidized) (Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-CysSO<sub>3</sub>-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-CysSO<sub>3</sub>-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala) were from Sigma Chemicals (St. Louis, MO).

Milli-Q grade water was used for preparation of sample solutions. Other reagents and solvents were commercially obtained and used without further purification.

**Copolymerization Procedure.** Semitelechelic IPAAm copolymers were prepared by radical telomerization of IPAAm and BMA in DMF using MPA as telogen, as reported in previous papers.<sup>21,22</sup> Typical procedures were as follows: IPAAm (0.22 mol) and BMA (2.2 mmol) were dissolved in DMF (50 mL). AIBN (0.88 mmol) and MPA (6.25 mmol) were used as an initiator and a chain transfer agent, respectively. The reaction mixture was degassed by subjecting to freeze-thaw cycles, and the ampule containing the monomer solution was sealed under reduced pressure. The reaction proceeded at 70 °C for 5 h. After the reaction solution was concentrated by evaporation, the reactant was poured into diethyl ether to precipitate the polymers. The polymer was further purified by repeated precipitation from tetrahydrofuran (THF) into diethyl ether. The molecular weight of the polymers was determined by end group titration with standardized 0.01 M NaOH using phenolphthalein as an indicator. Proton NMR spectra were recorded for CDCl<sub>3</sub> solutions of the copolymers on a spectrometer operating at 500 MHz frequency

(17) Takei, Y. G.; Aoki, T.; Sanui, K.; Ogata, N.; Sakurai, Y.; Okano, T. *Macromolecules* 1994, 27, 6163–6166.

(18) Yoshida, R.; Uchida, K.; Kaneko, Y.; Sakai, K.; Kikuchi, A.; Sakurai, Y.; Okano, T. *Nature* 1995, 374, 240–242.

(19) Kanazawa, H.; Yamamoto, K.; Matsushima, Y.; Takai, N.; Kikuchi, A.; Sakurai, Y.; Okano, T. *Anal. Chem.* 1995, 68, 100–105.

(20) Taylor, L. D.; Cerankowski, L. D. *J. Polym. Sci., Polym. Chem.* 1975, 13, 2551–2570.

(21) Takei, Y. G.; Aoki, T.; Sanui, K.; Ogata, N.; Okano, T.; Sakurai, Y. *Bioconjugate Chem.* 1993, 4, 341–346.

(22) Takei, Y. G.; Aoki, T.; Sanui, K.; Ogata, N.; Okano, T.; Sakurai, Y. *Bioconjugate Chem.* 1993, 4, 42–46.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(JMN-A500, JEOL, Tokyo, Japan) to determine the copolymer composition. Copolymer was abbreviated as IBC-X where I represents IPAAm, B is BMA, c denotes the terminal carboxyl end, and X is the BMA content in the copolymer in mole percent determined from NMR analysis.

**Transmittance Measurements.** LCSTs of IPAAm copolymers were determined by measuring the optical transmittance of copolymer aqueous solutions.<sup>22</sup> The optical transmittance of the copolymer solution (5 mg/mL) at various temperatures was measured at 500 nm using a UV/visible spectrophotometer (UV-240, Shimadzu, Kyoto, Japan). The temperature of the observation cell was controlled by a Lauda RCS-20D water bath with a deviation of  $\pm 0.02$  °C. LCST values for each copolymer was defined as the temperature where 50% optical transmittance of copolymer aqueous solutions was observed. Cloud points for copolymers was measured on a CPM-100 (Asahi Instrument Industry, Tokyo, Japan). Rates of heating and cooling for the sample cells were adjusted to 1 °C/min, and cloud points were measured at 600 nm.

**Modification of (Aminopropyl)silica with IBC Copolymers.** Modification of (aminopropyl)silica with IPAAm copolymers by activated ester-amine coupling was carried out via the same procedure as described in the previous reports.<sup>14,19</sup> Briefly, terminal carboxyl groups on the IBC copolymers were activated with SuOH using DCC in EtOAc at 4 °C for 2 h, followed at 25 °C for 12 h. After the removal of precipitated *N,N*-dicyclohexylurea (DCU) by filtration, activated IBC was recovered from dry diethyl ether. The succinimidyl group at the chain end was identified by IR spectrum at  $1780\text{ cm}^{-1}$  and an ultraviolet absorption at 260 nm in  $\text{NH}_4\text{OH}$ .<sup>23</sup>

To modify (aminopropyl)silica using active esterified IBC, 3 g of (aminopropyl)silica was mixed to IBC in dioxane solution (1.5 g/50 mL) and stirred overnight at 25 °C. This procedure was repeated three times, and the resulting copolymer-modified silica was washed with 500 mL of methanol, 1000 mL of distilled water, and 500 mL of Milli-Q grade water, consecutively. IBC-modified silica beads were then dried under vacuum. Under this modification process, 65–75% of amino groups on silica (180  $\mu\text{mol/g}$  of silica) were reacted with IBC copolymers as estimated by using s-SDTB.<sup>24</sup>

**Temperature-Responsive Elution Analyses for Steroids.** The polymer-grafted silica support was packed into a stainless-steel column (150 mm  $\times$  4.6 mm i.d.). The column was connected to an HPLC system (Hitachi Model L-6200 intelligent pump, L-4000 UV monitor, D-2500 data processor). A mixture of the steroids in water was used to produce the chromatograms. The concentration of each steroid was as follows: 101  $\mu\text{g/mL}$  for hydrocortisone, 7  $\mu\text{g/mL}$  for hydrocortisone acetate, 166  $\mu\text{g/mL}$  for prednisolone, 61  $\mu\text{g/mL}$  for dexamethasone, 27  $\mu\text{g/mL}$  for testosterone, and 13  $\mu\text{g/mL}$  for benzene. For temperature-responsive peptide elution analyses, the mixture of 1 mg/mL of each peptide was used. Analyses of mixed solutions were performed on temperature-responsive polymer-modified silica packed columns using Milli-Q water as a mobile phase. Elution behavior for the steroids was monitored at 254 nm at a flow rate of 1.0 mL/min at various temperatures thermostated with a water bath (Lauda RCS-20D) within a deviation of  $\pm 0.02$  °C.

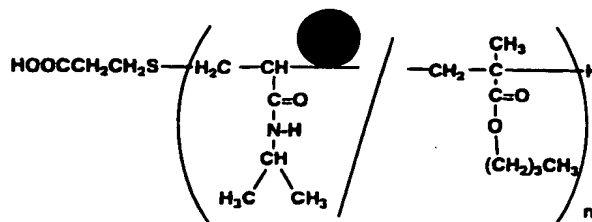


Figure 1. Structure of poly(IPAAm-co-BMA) copolymer (IBC-X).

Table 1. Analysis of Poly(IPAAm-co-BMA) (IBC-X) Copolymers Having a Semitelechelic Carboxyl Group Functionality

code	mole fraction of BMA (mol %)		mol wt <sup>b</sup>	LCST <sup>c</sup> (°C)	cloud point <sup>d</sup> (°C)
	in feed	obsd <sup>a</sup>			
IBC-0 (PIPAAm)	0	0	4300	32	32.0
IBC-0.6	1.0	0.6	6300	30	29.9
IBC-1.9	3.0	1.9	6700	23	26.5
IBC-3.2	5.0	3.2	6300	20	24.6

<sup>a</sup> Determined by <sup>1</sup>H NMR analyses. <sup>b</sup> Number-averaged molecular weight determined by end group titration. <sup>c</sup> LCST determined by transmittance measurement at 500 nm. <sup>d</sup> Cloud point measured on CPM-10 with a heating rate of 1 °C/min.

Capacity factors,  $k'$ , for each steroid at a given temperature were determined using the following equation:

$$k' = (t_R - t_0)/t_0$$

where  $t_0$  is the retention time (in min) of deuterium oxide ( $\text{D}_2\text{O}$ ) and  $t_R$  is the retention time for substances.

## RESULTS AND DISCUSSION

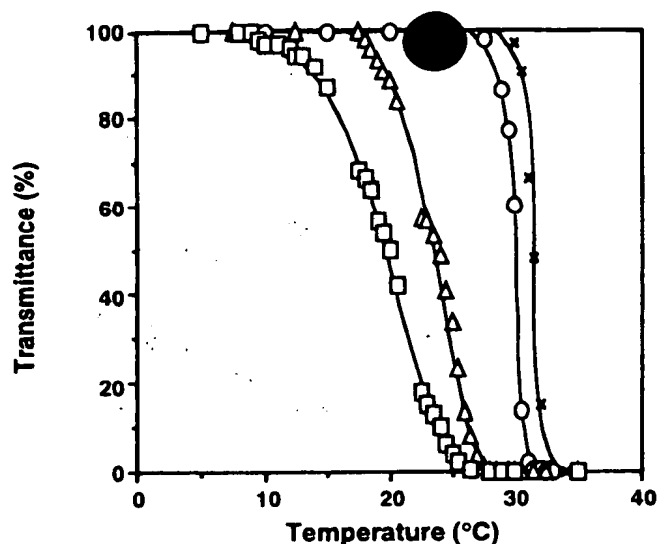
**Characterization of IPAAm Copolymers and Their Solubility Changes in Water.** Poly(IPAAm-co-BMA) (IBC) copolymers with single-terminal carboxyl groups of different compositions were synthesized by radical telomerization using MPA as a chain transfer agent (telogen) at 70 °C in DMF. Figure 1 shows the structure of semitelechelic IBC copolymers. IBC composition was determined from <sup>1</sup>H NMR spectra in  $\text{CDCl}_3$  solutions.<sup>21</sup> The mole fraction of BMA in IBC was calculated by comparing the peak area of the singlet at 0.90 ppm arising from terminal methyl protons of the butyl side chains with the area of the singlet at 4.01 ppm, attributed to the resonance of the methine proton from isopropyl groups. Table 1 summarizes the results of the copolymerization of IPAAm with BMA.

Figure 2 shows the temperature-dependent optical transmittance changes for IBC copolymers at 0.5 wt % aqueous solutions with various BMA compositions. LCST values for IBC copolymers are also indicated in Table 1. The LCST values for IPAAm polymers with carboxyl end groups can be regulated by the amount of hydrophobic comonomer, BMA. IBC copolymers all showed lower LCSTs than that for homogeneous PIPAAm. PIPAAm exhibits its LCST at 32 °C, while LCSTs shift from 32 to 20 °C with increase in the mole fraction of BMA over a range of 0.6–3.2 mol % in the copolymer. Although distinct LCSTs are observed for all IBC copolymers, the transitions become less sharp for the copolymer with higher BMA content. As BMA content in the copolymer increases, hydrophobic BMA molecules interrupt the IPAAm sequences, disrupting any segmental cooperative

(23) Miron, T.; Wilchek, M. *Anal. Chem.* 1982, 126, 433–435.

(24) Gaur, R. K.; Gupta, K. C. *Anal. Biochem.* 1989, 180, 253–258.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

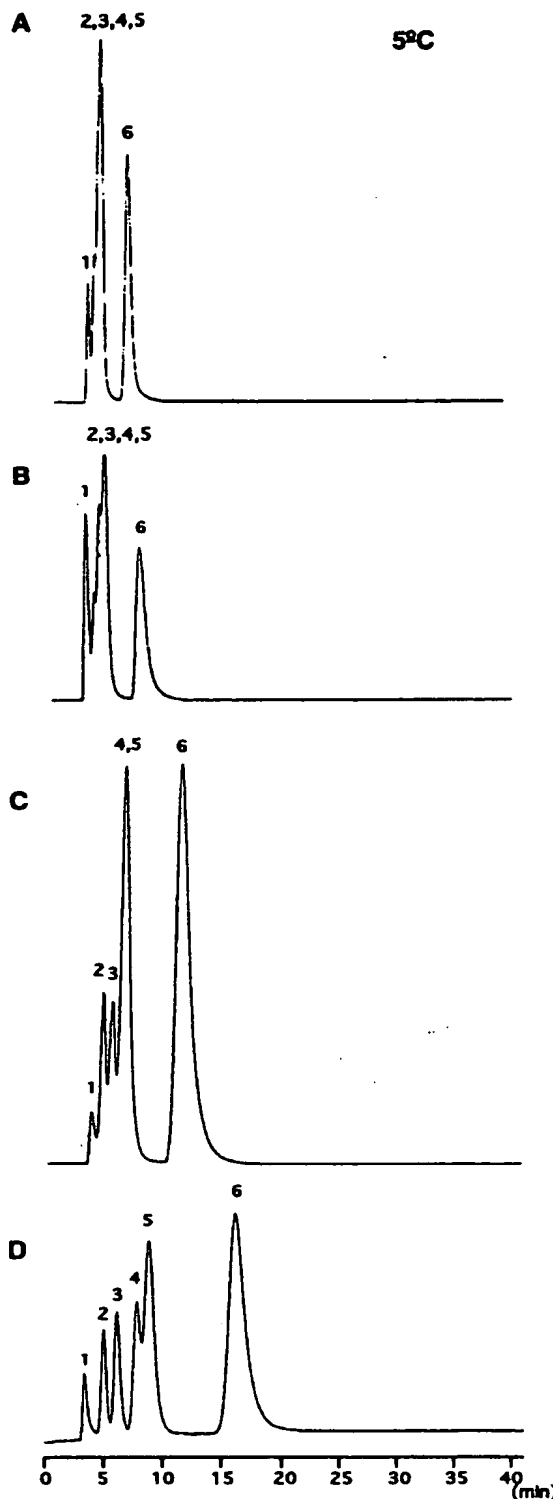


**Figure 2.** Temperature-dependent optical transmittance changes for IPAAm (co)polymer solutions with various BMA compositions: (x), PIPAAm; (O), IBc-0.6; ( $\Delta$ ), IBc-1.9; ( $\square$ ), IBc-3.2.

effects in temperature-dependent dehydration upon temperature increase. This affects the decreased temperature sensitivity with increasing BMA composition in IBc copolymers. To obtain IPAAm copolymers with rapid temperature responses, we chose copolymers with less than 5 mol % BMA.

**Temperature-Responsive Chromatography for Hydrophobic Steroids.** In an attempt to introduce hydrophobic sites into PIPAAm-modified supports, poly(IPAAm-co-BMA)-grafted silica was prepared and packed into columns. The immobilization reaction involved amide bond formation between the carboxyl end group in IBc copolymers and surface amino groups on the (aminopropyl)silica support using an activated ester-amine coupling reaction. This immobilization strategy is the same as reported previously.<sup>14,19</sup>

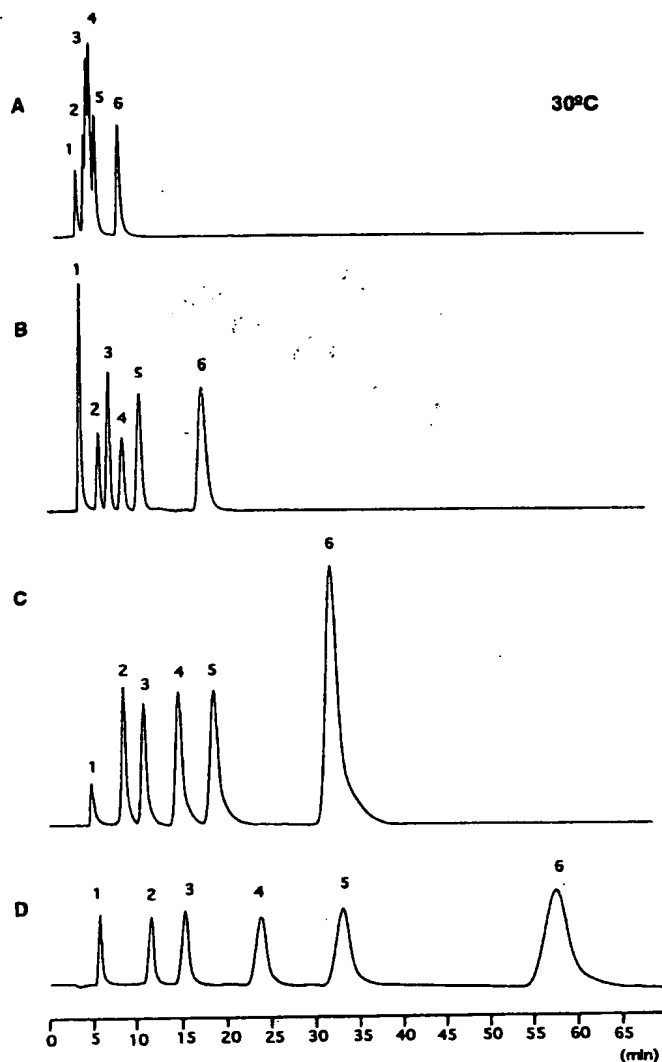
Temperature-responsive elution behavior was monitored by absorption at 254 nm using steroids with different hydrophobic properties in an aqueous mobile phase. We have reported that hydrophobic interactions between steroids and temperature-responsive surfaces is modulated by temperature due to hydrophilic-hydrophobic alterations of the solid surface.<sup>19</sup> Retention of steroids on PIPAAm-modified stationary phases is remarkably increased as the column temperature is raised. For the copolymer-modified silica support, the column temperature also influenced the retention of steroids. Figures 3–5 show chromatograms of the steroids on IBc-modified columns with different BMA compositions at 5, 30, and 50 °C, respectively. An increase in column temperature results in retarded retention times for steroids on IBc-modified columns as compared to the chromatograms shown in Figures 3–5. BMA content in IBc copolymers also affected steroid retention time, and longer steroid retention times were observed on IBc columns with higher BMA content at any given temperature. At 5 °C, where all copolymer modifiers exist in expanded conformations, sufficient resolution of steroids was not achieved on IBc-modified columns, especially for IBc-0 (PIPAAm) and IBc-0.6 (four types of steroids are not resolved). With increasing BMA content in the copolymer, however, sharp peaks are observed on IBc-3.2 (Figure 3D). As temperature is increased to 30 °C, baseline resolution of steroids was achieved for all IBc copolymer modified columns (Figure 4B–D), while steroids are



**Figure 3.** Chromatograms of the steroids on (A) PIPAAm-, (B) IBc-0.6-, (C) IBc-1.9-, and (D) IBc-3.2-modified HPLC columns at 5 °C with Milli-Q water as a mobile phase. Peaks (1) benzene, (2) hydrocortisone, (3) prednisolone, (4) dexamethasone, (5) hydrocortisone acetate, and (6) testosterone.

not completely resolved on the IBc-0 (pure PIPAAm) column (Figure 4A). With reference to the LCST of PIPAAm (Figure 2 and Table 1), PIPAAm-modified surface should be hydrophilic at 30 °C; this might be a reason for poor resolution of steroids on

**THIS PAGE BLANK**

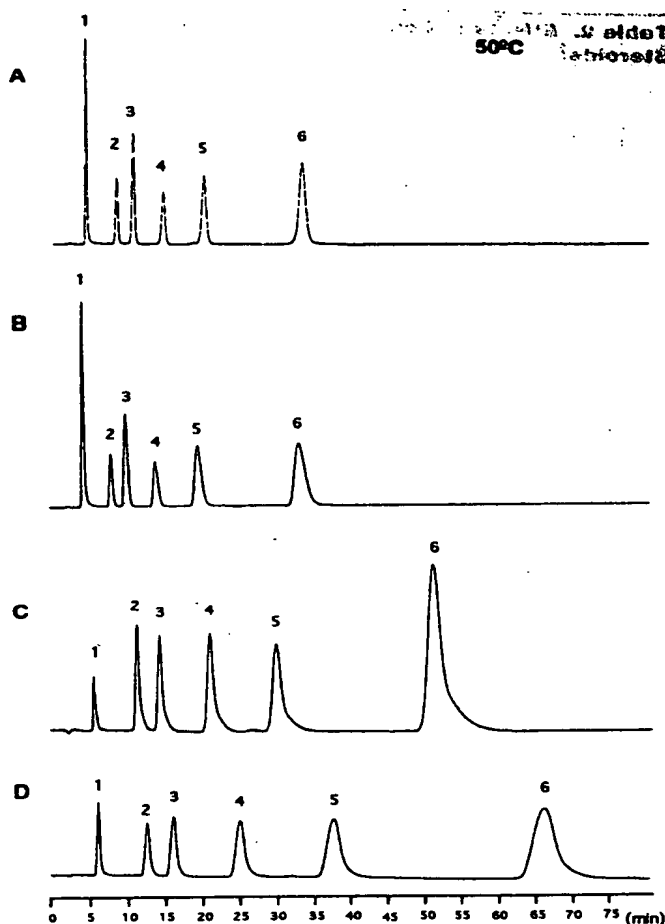


**Figure 4.** Chromatograms of the steroids on (A) PIPAAm-, (B) IBC-0.6-, (C) IBC-1.9-, and (D) IBC-3.2-modified HPLC columns at 30 °C with Milli-Q water as a mobile phase. Peak numbers in the figure are the same as in Figure 3.

PIPAAm column at 30 °C. At 50 °C, the baseline resolution for the steroid separation was achieved for all polymer-modified columns including PIPAAm, with larger retention of steroids observed on columns with higher BMA content.

Table 2 summarizes the capacity factors,  $k'$ , for steroids on IBC copolymer-modified columns at various temperatures. The  $k'$  values for each steroid were higher on IBC columns when compared with those on PIPAAm (IBC-0) at each temperature, except IBC-0.6 at 5 °C. As BMA content in the IBC copolymer increased from 0.6 to 3.2 mol %, capacity factor values for steroids dramatically increased at a given temperature. For example,  $k'$  values for testosterone at 5 °C were 2.45 for IBC-0.6 and 7.81 for IBC-3.2 and increased from 18.5 to 33.8 with increasing BMA content from 0.6 to 3.2 mol % in the copolymer at 50 °C. It should be noted that retention behavior of steroids could be altered on surfaces with only 0.6 mol % hydrophobic BMA in the copolymer.

Figure 6 shows the temperature-dependent capacity factor changes for steroids on the IBC-3.2 column. It is apparent from this figure that the capacity factors for steroids greatly increase



**Figure 5.** Chromatograms of the steroids on (A) PIPAAm-, (B) IBC-0.6-, (C) IBC-1.9-, and (D) IBC-3.2-modified HPLC columns at 50 °C with Milli-Q water as a mobile phase. Peak numbers in the figure are the same as in Figure 3.

with increasing temperature. In our previous paper,<sup>19</sup> we showed that the capacity factors for steroids significantly increased above the PIPAAm transition temperature. This was the same case for IBC-3.2. It is explained by the increased hydrophobic interaction between hydrophobic steroids and hydrophobized surfaces of IBC-3.2 due to the dehydration of IBC-3.2 molecules above this transition temperature. As can be seen in Figure 6, increased capacity factors for steroids on IBC-3.2 are observed even below 20 °C, below which the IBC-3.2 molecule changes its conformation to a hydrated, expanded form. On PIPAAm surfaces, however, only a small change in capacity factors of steroids are seen below the PIPAAm LCST. In the case of IBC copolymers, hydrophobic BMA components dispersed within the hydrated IPAAm sequences enhance the hydrophobic interaction with hydrophobic substances even under the condition where IBC molecules on silica surfaces exist in hydrated and expanded conformations. This could result in increased capacity factors for IBC columns below their transition temperatures. It may also be plausible that the presence of hydrophobic BMA disturbs hydration of adjacent IPAAm units, resulting in increased hydrophobic interactions between the IBC stationary phase and hydrophobic steroids.

Partition coefficients,  $P$ , for the substances in an octanol–water system are known to represent the relative order of hydrophobic-

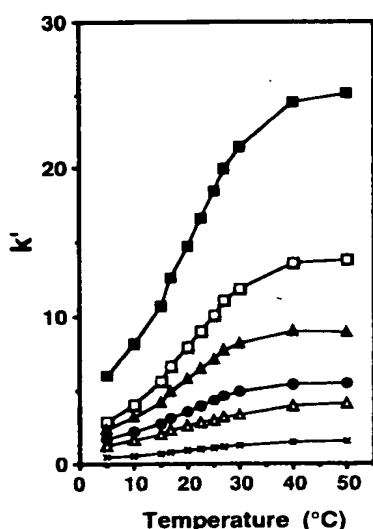
THIS PAGE BLANK (cont.)



**Table 2. Effects of Column Temperature and BMA Composition in IBc Copolymer on Capacity Factors,  $k'$ , for Steroids**

column temp (°C)	column code	steroids (log $P$ value <sup>a</sup> )					
		benzene (—)	hydrocortisone (1.61)	prednisolone (1.62)	dexamethasone (1.83)	hydrocortisone acetate (2.30)	testosterone (3.32)
5	IBc-0	0.42	0.75	0.95	1.17	1.23	2.81
	IBc-0.6	0.26	0.64	0.82	0.96	1.08	2.45
	IBc-1.9	0.63	1.16	1.54	2.00	2.12	4.55
	IBc-3.2	0.63	1.75	2.50	3.48	3.77	7.81
	ODS <sup>b</sup>	6.27	12.6	12.4	18.7	20.8	44.4
30	IBc-0	0.42	0.75	0.95	1.17	1.23	2.81
	IBc-0.6	0.54	1.62	2.17	2.90	3.81	7.17
	IBc-1.9	1.00	2.75	3.77	5.60	7.47	13.6
	IBc-3.2	1.63	4.58	6.28	10.6	16.1	28.9
	ODS <sup>b</sup>	5.18	4.19	4.10	5.52	6.30	12.8
50	IBc-0	1.11	3.04	4.02	5.89	8.42	15.0
	IBc-0.6	1.24	3.48	4.63	7.02	10.3	18.5
	IBc-1.9	1.58	4.38	5.82	8.91	13.1	23.3
	IBc-3.2	1.96	5.55	7.43	12.2	18.6	33.8

<sup>a</sup> log  $P$  values from ref 25. <sup>b</sup> ODS column (Hitachi gel 3056, 150 mm × 4.0 mm i.d.); eluent, 50% aqueous methanol.



**Figure 6.** Changes in capacity factors for five steroids and benzene on IBc-3.2-modified silica supports over a variety of column temperatures: (x), benzene; (Δ), hydrocortisone; (●), prednisolone; (▲), dexamethasone; (□), hydrocortisone acetate; (■), testosterone.

ity.<sup>25</sup> The log  $P$  values for the steroids are shown in Table 2. The order of their separation on temperature-responsive polymer-modified columns depends on the hydrophobicities of the steroids, corresponding with the increasing order of the log  $P$  values. In other words, steroids with higher hydrophobicities show longer retention times on IBc-modified columns at a given temperature. The data shown indicate that the driving force for retention of steroids is the hydrophobic interactions between the solute molecules and polymer chains on the silica surface.

Figure 7 shows the van't Hoff plots for steroids with a variety of hydrophobicity values on the IBc copolymer-modified columns. Generally, the plots should be linear for a normal chromatographic process on commercially available reversed phase columns under conditions where the retention mechanism is constant. On temperature-responsive copolymer-modified columns, however,

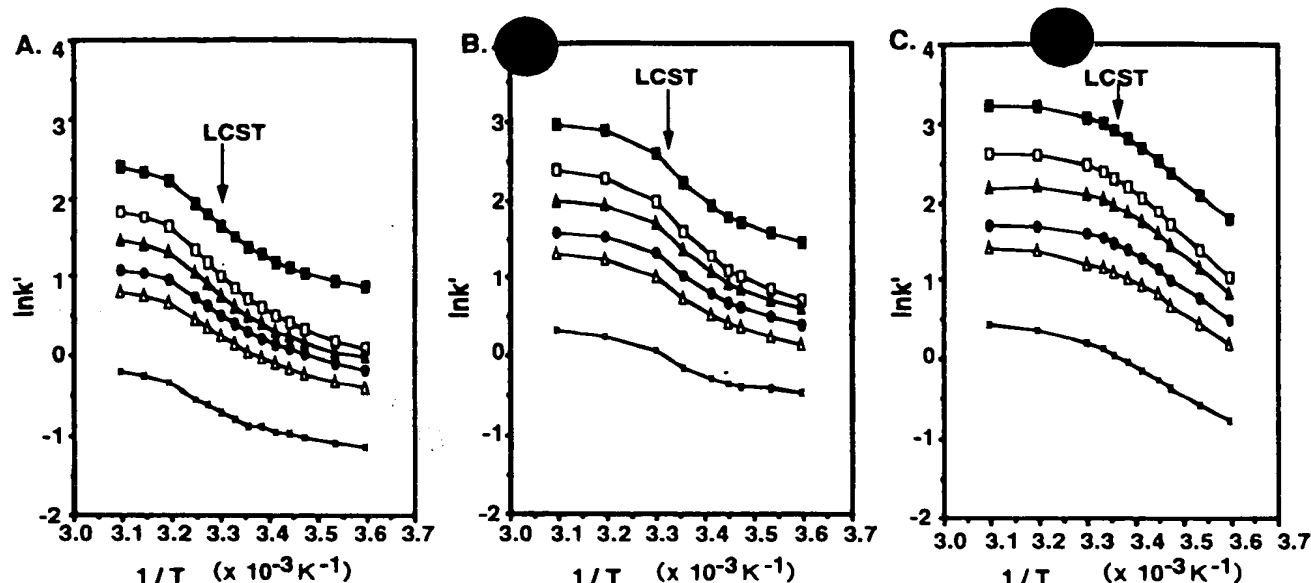
the deviation from linearity was found between ln  $k'$  values and reciprocal temperature ( $1/T$ ). These discontinuities in the plots suggest phase transitions of surface-grafted IBc molecules. LCSTs of IBc copolymers shift to lower temperature as the mole fraction of BMA increases. This can be seen in Figure 2, which should reflect the phase transition of the copolymer on the surface. Interestingly, the slope of the van't Hoff plots on the copolymer column is negative, which is opposite to that on the normal chromatography system. As reported previously,<sup>19</sup> this can be explained by the increased interaction forces between steroids and hydrophobized stationary phases with temperature.

Chromatographic characteristics of the copolymer-modified silica stationary phases were compared with those of commonly used (octadecyl)silica (ODS) stationary phase. An attempt was made to evaluate the  $k'$  values of the steroids on an ODS column (Hitachi gel 3056, 150 × 4.0 mm i.d.) using same conditions as that used for IBc copolymer-modified columns. None of these steroids was eluted from the column over a 2-h period with Milli-Q water as a mobile phase. To separate the same steroids on an ODS column, it was necessary to use organic solvents, such as methanol, and acetonitrile, mixed with an aqueous mobile phase to change the mobile phase polarity. In reversed phase HPLC using ODS columns, chromatographic separation selectivity is primarily controlled by changing the polarity of the mobile phase and not by the column temperature. The capacity factors of steroids on ODS columns decrease as the column temperature increases. The capacity factors of benzene and steroids used in this experiment are listed in Table 2. These values were evaluated on ODS column with 50% aqueous methanol as mobile phase at 5 and 30 °C. Decreased  $k'$  values are apparent for ODS columns by changing the column temperature from 5 to 30 °C. In contrast, columns packed with IBc copolymer-modified silica showed increased  $k'$  values with temperature, indicating increased interaction between steroids and temperature-responsive stationary phases.

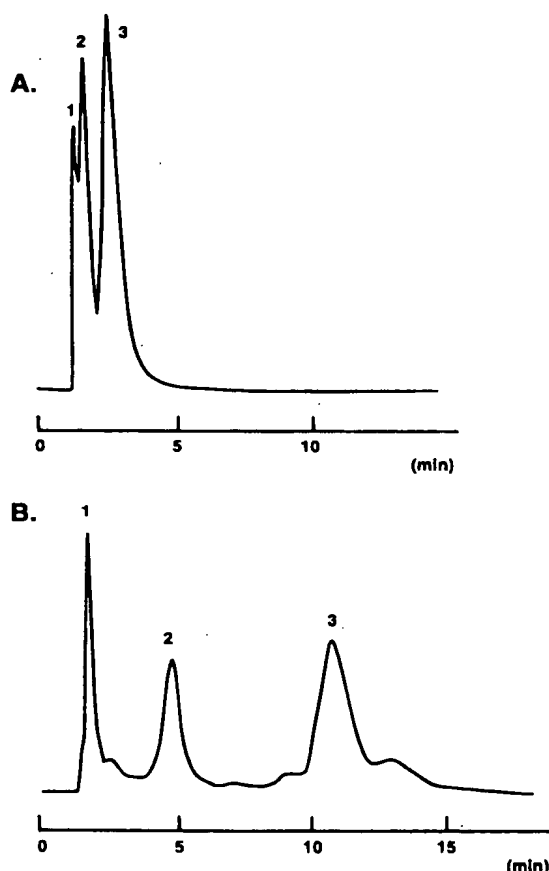
As discussed in the previous section, our proposed temperature-responsive chromatography can be used with an aqueous mobile phase without mixing any organic solvents. For protein separations and purification, this characteristic might be an advantage because denaturation of proteins using organic solvents

(25) Hansch, C., Leo, A., Hoekman, D., Eds., *Exploring QSAR—Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants*; ACS Professional Reference Book; American Chemical Society: Washington, DC, 1995.

**THIS PAGE BLANK (usr)**



**Figure 7.** The van't Hoff plots for steroids on copolymer-modified HPLC columns: (A) IBC-0.6, (B) IBC-1.9, and (C) IBC-3.2. The symbols in the figure are the same as in Figure 6.



**Figure 8.** Chromatograms of the mixture of insulin chain A,  $\beta$ -endorphin fragment 1–27, and insulin chain B on the IBC-3.2-modified column using 0.5 M NaCl aqueous solution (pH 2.1) as a mobile phase at (A) 5 °C and (B) 30 °C. Peaks: (1) insulin chain A, (2)  $\beta$ -endorphin fragment 1–27, and (3) insulin chain B.

tions of three peptides were applied to IBC-3.2 columns with changing temperature. Figure 8 shows separation of the mixture of bovine insulin chain A, human  $\beta$ -endorphin fragment 1–27, and bovine insulin chain B on the IBC-3.2-modified silica column. Chromatograms were obtained using 0.5 M NaCl aqueous solution (pH 2.1) as a mobile phase. Three peptides, consisting of 21–30 amino acid residues, were not separated at 5 °C (below the LCST of IBC-3.2). As the column temperature was raised to 30 °C, the three peptides were well-resolved. When we compared amino acid sequences for the three peptides, the number of relatively hydrophobic amino acid residues (leucine, isoleucine, phenylalanine, tryptophan, tyrosine, valine) increased in the order of insulin chain A <  $\beta$ -endorphin fragment 1–27 < insulin chain B, which corresponds directly to their respective retention times. As discussed above, hydrophobic interactions are a primary separating force between solute and an IBC-modified surface. The hydrophobic nature of these peptides, therefore, has primarily influenced the retention behavior of these peptides.

These results demonstrate that stationary phases prepared through conjugation of IPAAm copolymers onto silica are useful in high-performance liquid chromatography not only for steroids but also for peptide and protein separations. In such separations, retention on the supports is considered to occur through hydrophobic interaction between protein and polymer chains. Other polypeptide and protein separations using temperature-responsive chromatography are currently in progress in our laboratory.

## CONCLUSIONS

Hydrophobic BMA was incorporated into semitelechelic PI-PAAm through radical telomerization, and the resulting copolymers were used as modifiers of an (aminopropyl)silica stationary phase for temperature-responsive chromatography. By altering copolymer composition, we can control the LCST and thus the surface hydrophobicity of the stationary phases. Changes in the BMA content and corresponding hydrophilic–hydrophobic surface properties resulted in subsequent changes in elution time for substances using temperature-responsive chromatography.

to separate proteins is likely, resulting in decreased bioactivity of the separated proteins. To explore the possibility of temperature-responsive chromatography in peptide separation, mixture solu-

**THIS PAGE BLANK (USPIC)**

With increasing BMA content in the copolymers, increased hydrophobic interaction between solutes and the IBc copolymer-grafted surfaces of the stationary phases was observed even at temperatures below their LCST. We have succeeded in demonstrating reversed phase HPLC-like separation selectivity of many steroids by simply changing column temperature with pure water as a mobile phase. Temperature-responsive chromatography would be highly useful for peptide and protein as well as steroid separation. The described copolymer-modified stationary phase is able to separate solutes without the use of organic solvents. This has advantages in (1) maintaining biological activity for peptides and proteins, (2) environmental impact (reduced pollution by organic solvents), and (3) reducing reagent costs for a preparation of mobile phase.

#### ACKNOWLEDGMENT

The authors express their appreciation to Professor David W. Grainger, Colorado State University, for his valuable discussions on this research. Part of this work was supported by the Ministry of Education, Science, Sports and Culture Japan (Grant 07408030), and by Kumagai Foundation for Science and Technology.

Received for review October 4, 1996. Accepted December 12, 1996.\*

AC961024K

---

\* Abstract published in *Advance ACS Abstracts*, February 1, 1997.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## Effect of temperature upon the chromatography of proteins on porous glass, chemically coated with N-isopropylacrylamide copolymer

A.E. Ivanov\*, L.S. Zhigis, E.V. Kurganova, V.P. Zubov

*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Miklukho-Maklaya 16/10, 117871, V-437 Moscow, Russian Federation*

### Abstract

Wide-pore glass chemically coated with a copolymer of N-isopropylacrylamide (NIPAA) and N-hydroxyethylacrylamide (70:30) was studied as a weak-hydrophobic sorbent for chromatography of proteins. The temperature dependence of the lysozyme chromatographic retention points to the maximum near a lower critical solution temperature of the copolymer (LCST, 41°C). Nevertheless,  $\log k'$  vs.  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  plots found for lysozyme at 25°C and 45°C are only slightly different and indicate almost zero free energies of interaction between the protein and the copolymer in 0.01 M potassium phosphate solution, pH 7.5. No temperature-modulated desorption of immunoglobulin G adsorbed to the copolymer-coated glass at 45°C was observed when cooling the column to 30°C. Changes in protein interactions with the polymer grafts are apparently too weak to ensure an effective control of protein adsorption with temperature shift near LCST. © 1997 Elsevier Science B.V.

**Keywords:** Polyisopropylacrylamide sorbents; Stationary phases; Phase transitions; Temperature effects; Proteins

### 1. Introduction

Poly(N-isopropylacrylamide) displays a lower critical solution temperature (LCST) within the range 32 to 34°C in water [1,2]. Cross-linked gels of copolymerized N-isopropylacrylamide (NIPAA) undergo a volume phase transition under the same conditions [3,4]. Thermoresponsive properties make these materials promising for preparation of temperature-modulated bioconjugates [5], biosorbents [6,7] and supports for cell cultivation [8,9]. Although many applications of NIPAA for the above purposes are known and many grafting techniques proposed, only a few studies of poly(NIPAA)-coated inorganic sorbents and their interaction with proteins have been carried out [7,10].

Porous glass chemically modified with poly(NIPAA) was studied as a support for gel permeation chromatography of dextrans. Their elution volumes strongly depended on temperature near 30°C, perhaps due to a change of effective porosity of the bonded phases [10]. Narrow-pore glass (pore diameter of 156 Å) grafted with longer poly(NIPAA) molecules ( $M_r$  3.4·10<sup>3</sup>) displayed a stronger effect on the elution behaviour of dextrans than wide-pore glass (408 Å). Presumably, transition of the end-grafted poly(NIPAA) chains from coils to globules might enhance the internal pore volume of the particles accessible to dextran penetration.

Poly(NIPAA)-grafted silica gel was prepared by coupling the NIPAA oligomer ( $n < 14$ ), bearing a primary amino group at the end of its chain, to the glutaraldehyde-activated carrier [7]. After reduction of the residual aldehydes to alcohols by sodium

\*Corresponding author.

**THIS PAGE BLANK (USP)**



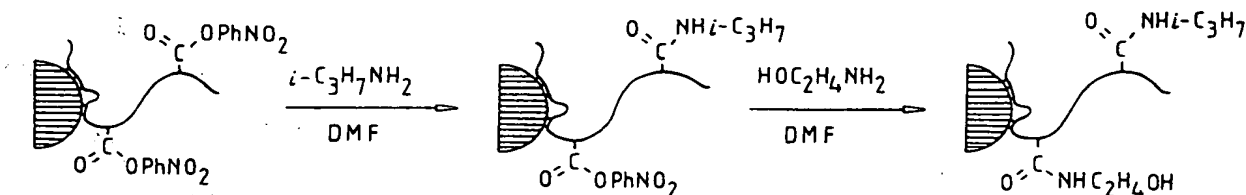


Fig. 1. Synthesis of isopropyl-PA-glass from the carrier chemically coated with poly(*p*-nitrophenyl acrylate).

borohydride, the prepared sorbent bound bovine  $\gamma$ -globulin in 0.067 M phosphate solution (pH 7) at 37°C and 62% of the adsorbed protein was released into the same solution at 24°C, presumably due to the diminished hydrophobic interactions. Incomplete protein desorption was ascribed by the authors to its denaturation proceeding in contact with poly(NIPAA) at 37°C.

This paper describes preparation of porous glass chemically coated with NIPAA copolymer. The synthetic route includes chemisorption of poly(*p*-nitrophenyl acrylate), PNPA, (a reaction studied by us previously [11]), followed by amidation of the reactive esters with isopropylamine (see Fig. 1). The *n*-butyl group containing analogous sorbent, was prepared for comparison. Both the sorbents have a weak-hydrophobic character, partially investigated by us elsewhere [12]. The present study is aimed at registering changes in elution behaviour of standard proteins induced by thermal phase transition in the polymer coating of the stationary phase. It seems interesting to outline distinctions between the protein adsorption below and above LCST and thereby to better understand the mechanism of poly(NIPAA) interaction with proteins.

## 2. Experimental

Wide-pore glass MPS-2000 VGKh (mean pore diameter 2000 Å, particle size 0.16–0.31 mm) was purchased from GOZ VNII NP (N. Novgorod, Russia). Isopropylamine was from Riedel-de Haen, Seelze, Germany. Ammonium sulfate, potassium dihydrogen phosphate, potassium hydroxide and dimethylformamide (DMF), all analytical grade, were provided by Reakhim, Moscow, Russia; lyso-

zyme and immunoglobulin G were from Serva, Heidelberg, Germany.

Poly(*p*-nitrophenyl acrylate), PNPA,  $\bar{M}_w = 46\,200$ ,  $\bar{M}_w/\bar{M}_n = 3.4$  was synthesized by radical polymerization of the monomer as described in Ref. [11].

Weak-hydrophobic sorbent coated with copolymer of NIPAA, isopropyl-PA-glass was prepared from the wide-pore glass chemically coated with PNPA (PNPA-glass) [11] as follows. 5 g of PNPA-glass (the ester group content of 184  $\mu\text{mol/g}$  or ca. 6  $\mu\text{mol/m}^2$ ) was added to the solution of isopropylamine (260  $\mu\text{l}$ , 3-molar excess of amine) in 25 ml DMF. The reaction was allowed to proceed for 1 week at room temperature, then the second portion of isopropylamine was added and the reaction mixture was incubated in a water bath at 80°C for 2 h. 70% of *p*-nitrophenyl esters were substituted by isopropylamine as estimated by photometric assay of *p*-nitrophenol ( $\lambda_{\text{max}} = 400\text{ nm}$ ,  $\epsilon = 15\,300\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ), the product of the reaction. The residual esters were amidated by adding ethanolamine (1 ml) during overnight incubation at room temperature. The prepared sorbent was washed by distilled water and stored as a wet cake at 8°C. The glass sorbent with *N*-butylpolyacrylamide coating was prepared as described in Ref. [12].

To prepare a water-soluble copolymer of *N*-isopropylacrylamide, co(NIPAA), 30 mg of PNPA was dissolved in dimethylformamide (1 ml), then a 3-molar excess of isopropylamine (50  $\mu\text{l}$ ) was added to the solution and left for overnight at room temperature. The second portion of isopropylamine (50  $\mu\text{l}$ ) was then added and the reaction mixture incubated in water bath at 70°C for 2 h. 70% of *p*-nitrophenyl groups were substituted by isopropylamine, as estimated by photometric assay of *p*-nitrophenol ( $\lambda_{\text{max}} = 400\text{ nm}$ ,  $\epsilon = 15\,300\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ), the product of the reaction. The residual

**THIS PAGE BLANK (USPT.)**

esters were amidated by adding ethanolamine (250  $\mu$ l) during overnight incubation at room temperature. The prepared copolymer was separated from low-molecular-mass compounds by gel-permeation chromatography on a  $44 \times 1.5$  cm column packed with Bio-Gel P6 (Bio-Rad Labs., USA), equilibrated with 10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , and then lyophilized. IR spectrum of the copolymer was registered by a Shimadzu IR-435 apparatus (Japan).

Hydrophobic-interaction chromatography was performed on  $9 \times 1$  cm glass columns, equipped by thermostatted water jackets at a flow-rate of 0.5–0.7 ml/min controlled by peristaltic pumping. A 1 mg sample of lysozyme in 0.5 ml of 0.01 M phosphate buffer (pH 7.5), containing varied concentrations of ammonium sulfate, was applied to the column and eluted with the same solution. LKB Uvicord II was used for detection of absorbing fractions ( $\lambda = 280$  nm) during chromatography.

Effect of temperature on chromatographic retention of lysozyme on isopropyl-PA-glass and butyl-PA-glass was studied in 0.01 M phosphate buffer (pH 7.5), containing 1.5 M ammonium sulfate at temperatures from 7°C to 55°C, controlled by a U1 thermostat (VEB MLV, Germany).

Dynamic light scattering by co(NIPAA) aqueous solutions (15 mg/ml) at various temperatures was registered by a laser light scattering analyser, registration angle 90°, model N4SD, Coulter Electronics, USA.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Characterization of the NIPAA copolymer

Fig. 2 shows IR spectra of poly(*p*-nitrophenyl acrylate), PNPA and copolymer of N-isopropylacrylamide, co(NIPAA), prepared by amidation of PNPA by N-isopropylamine. Strong absorbance of *p*-nitrophenyl ester group carbonyl ( $1760 \text{ cm}^{-1}$ ) presented in PNPA spectrum can not be found in the spectrum of co(NIPAA). Characteristic absorbances of the nitrogroup ( $1340$  and  $1520 \text{ cm}^{-1}$ ) and aromatic ring ( $1480$  and  $1590 \text{ cm}^{-1}$ ) are also absent, the facts testify to complete substitution of the reactive PNPA esters for N-substituted amides. The absorbances of the latter ( $1650$  and  $1550 \text{ cm}^{-1}$ ,

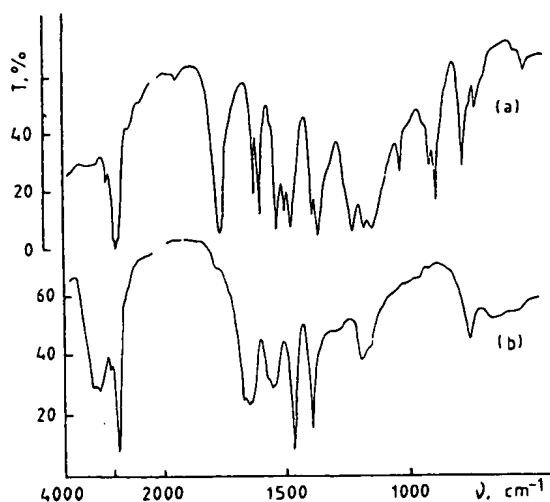


Fig. 2. IR-spectra of polymers: (a) poly(*p*-nitrophenyl acrylate), PNPA; (b) copolymer of NIPAA prepared by amidation of PNPA with isopropylamine and ethanolamine.

i.e., amide I and amide II, respectively) are both present in the co(NIPAA) spectrum. No absorbance is observed within the range  $1700$  to  $1750 \text{ cm}^{-1}$ , indicating no free carboxyl group in the copolymer. Therefore, co(NIPAA) contains only N-alkylamide functions, concretely, 70% of NIPAA units and 30% of N-hydroxyethylacrylamide units as estimated by the amount of liberated *p*-nitrophenol (see Section 2).

Fig. 3 shows the intensity of light scattering by aqueous solutions of co(NIPAA) as a function of temperature. The light scattering is rather slight at temperatures lower than 40°C and displays a steep increase at 41°C. The registered LCST is, therefore, higher than that of poly(NIPAA), known to fit a narrow range between 32 and 34°C [2] depending on a polymer chain length. The LCST increase may be ascribed to the presence of hydrophilic N-hydroxyethylacrylamide units in the co(NIPAA) chains. The similar effect was recently found for NIPAA and N,N-dimethylacrylamide copolymer [13], the latter monomer being more hydrophilic than NIPAA.

Solubility of co(NIPAA) in water becomes poorer in the presence of ammonium sulfate. The copolymer cannot be dissolved in 1 M ammonium sulfate, whereas its solutions in 0.3 M and 0.8 M ammonium sulfate are somewhat cloudy. They scatter light more

**THIS PAGE BLANK (User)**

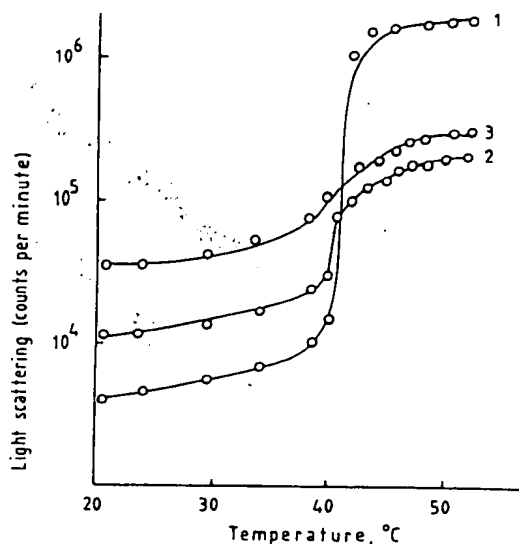


Fig. 3. Intensities of dynamic light scattering by 15 mg/ml solution of co(NIPAA) in water (1), 0.3 M (2) and 0.8 M (3) ammonium sulfate as a function of temperature.

intensively even below 41°C (see curves 2 and 3 in Fig. 2), probably due to a partial association of co(NIPAA) caused by a salting-out effect. This may underlie the reason why the increase of light scattering at 41°C is not so steep in the solutions of co(NIPAA), containing ammonium sulfate: the copolymer is already involved in the other type of association. We did not notice, however, any shift of LCST to lower temperatures promoted by the high salt concentration, unlike reported for poly(NIPAA) by other researchers [2].

### 3.2. Chromatography of proteins

Retention of proteins in hydrophobic-interaction chromatography usually increases with increasing temperature [14]. We have also found a linear dependence of elution volume of lysozyme on the temperature on butyl-PA-glass column (Fig. 4, line 1). The dependence obtained for the same protein on isopropyl-PA-glass column is quite different, with the broad maximum nearby LCST (Fig. 4, line 2). As lysozyme is known to be stable in aqueous solution up to 70°C [14], one may ascribe the change in retention mechanism to a thermal transition of the

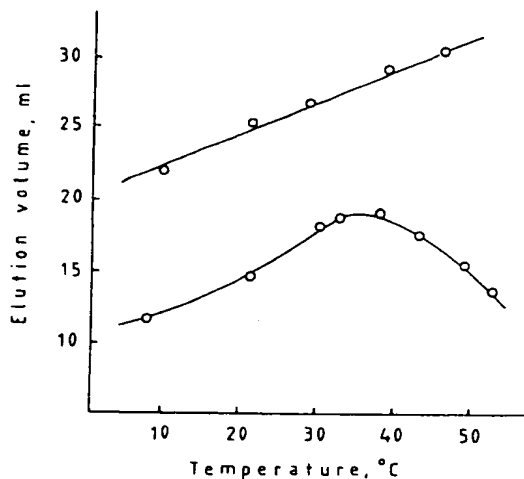


Fig. 4. Effect of temperature on chromatographic retention of lysozyme on isopropyl-PA-glass and butyl-PA-glass. For conditions see Section 2.

coating copolymer within the bonded phase. The abnormal temperature dependence registered for lysozyme on isopropyl-PA-glass column prompted us to study the influence of salt concentration on retention of the protein below and above its LCST.

A characteristic feature of hydrophobic-interaction chromatography is the possible isocratic elution of proteins with rather high retention factors  $k'$ . By increasing the salt concentration the retention factor increases so that the dependence of  $\log k'$  on molarity often becomes linear. The limiting slope of this plot is given by the hydrophobic-interaction parameter (HIP) accounting for the interaction area between the protein and the sorbent, the surface tension increment of the salt and the dipole moment of the protein molecule [15]. For a given protein solute eluted at various concentrations of ammonium sulfate HIP is a measure of the contact area between the solute and the sorbent employed. The intercept of the  $\log k'$  vs.  $M$  plots gives the logarithm of the retention factor of the solute in the absence of salt in the eluent, the parameter related to free energy of hydrophobic interaction between the sorbent and the solute.

Chromatographic retention factor  $k'$  equals  $K(V_s/V_m)$ , where  $K$  is a distribution coefficient of the solute between the solid and mobile phases,  $V_m$  and  $V_s$  are volumes of the mobile phase and the solid-

**THIS PAGE BLANK (USP)**

phase available for the solute in the column, respectively [16]. As  $K$  is a function of the free energy of interaction:  $K = \exp(-\Delta F/RT)$  [17], the logarithmic retention factor may be expressed as follows:

$$\log k' = \log e(-\Delta F/RT) + \log V_s/V_m \quad (1)$$

Therefore, if a limiting value of  $\log k'$ , related to the absence of salt in the eluent, and  $V_s/V_m$  are known, one may calculate  $\Delta F$  and discover if the protein adsorption is thermodynamically favorable due to hydrophobic interactions or not.

Although an accurate calculation of  $V_s$  is a somewhat special problem, one may evaluate  $V_s$  either from the maximal adsorption capacity of isopropyl-PA-glass (ca. 6 mg lysozyme/ml sorbent) or from the overall volume of the polymeric coating, its thickness is known to be about 5 nm as found by mercury porosimetry [11]. These two methods give  $V_s$  values of 21 or 150  $\mu\text{l/g}$  dry sorbent, respectively, the former one seems to be more realistic.  $V_s$  is about 3 ml/g dry sorbent, so  $\log V_s/V_m \sim -2.1$ . From Eq. (1) appears that  $\log k'$  values above  $-2.1$  correspond to adsorption of lysozyme to the sorbent ( $\Delta F < 0$ ).

Fig. 5 shows the  $\log k'$  vs.  $M$  plots obtained for lysozyme chromatographed on isopropyl-PA-glass and butyl-PA-glass sorbents at different temperatures. The polymer coatings of both the sorbents are poorly swollen at 45°C and/or self-associated because N-butylpolyacrylamide is insoluble in water, whereas co(NIPAA) is above its LCST. Thus, their contact areas with lysozyme are not much different, that of butyl-PA-glass being slightly larger, perhaps due to a larger volume of butyl radical. Furthermore, at high ammonium sulfate concentrations (above 0.8 M) almost no difference is observed between the isopropyl-PA-glass adsorptivities displayed at 25 and 45°C. This is due to an association of co(NIPAA) at 25°C under these conditions (see Fig. 3, curve 3). The salted-out polymer might not spread its segments far into solution and thereby change the contact area and the energy of interaction with the protein.

The intercepts of  $\log k'$  vs.  $M$  plots found for isopropyl-PA-glass are rather close to  $-2$ , that means nearly zero (or only slightly negative) free energy of lysozyme adsorption in the absence of

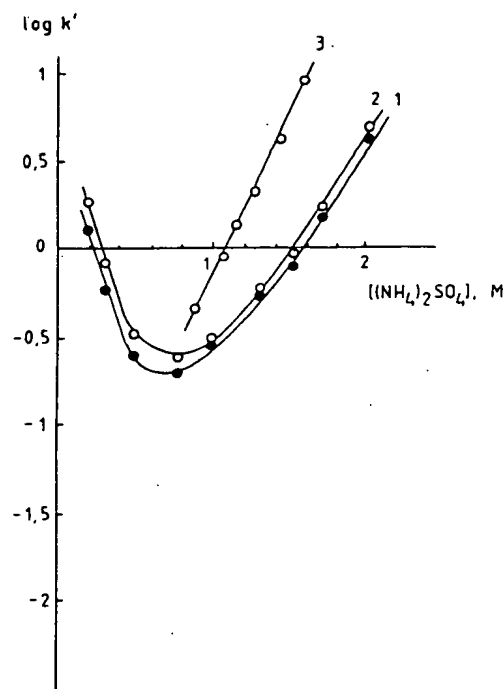


Fig. 5. Logarithm of the retention factor ( $\log k'$ ) of lysozyme plotted versus molar concentration of ammonium sulfate. Isocratic hydrophobic-interaction chromatography on isopropyl-PA-glass at 45°C (1) and 25°C (2) and butyl-PA-glass at 45°C (3). For conditions see Section 2.

ammonium sulfate. In other words, one may expect insufficient hydrophobic interaction of the protein with co(NIPAA) in 0.01 M potassium phosphate aqueous solution either at 25 or at 45°C.

On the other hand, a small difference in lysozyme retention factors at 25 and 45°C is observed at lower ammonium sulphate concentrations (below 0.8 M). The left upward branches of  $\log k'$  vs.  $M$  dependencies were earlier registered at low salt concentrations for lysozyme chromatographed on polyethylene glycol-coated silicas [15] and ascribed to electrostatic attraction of the positively charged protein to silica matrices. The swollen polymer reduce the interaction of the protein with inorganic support more effectively, thus making the elution volumes registered at 25°C smaller.

Temperature-induced desorption of immunoglobulin-G (IgG) adsorbed to a poly(NIPAA)-coated

THIS PAGE BLANK (3)



silica was recently described [7]. We attempted to reproduce this effect with isopropyl-PA-glass. Under the conditions used in the above mentioned study (0.067 M phosphate buffer, pH 7.0 [7]), IgG could not be irreversibly adsorbed to isopropyl-PA-glass, but quantitatively eluted as an asymmetrical peak nearby the total volume of the column, i.e., a weak reversible adsorption took place. The protein (1 mg) could be partially adsorbed to isopropyl-PA-glass from 0.01 M phosphate buffer (pH 7.5), containing 0.15 M NaCl and 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  at 45°C. About 50% of the protein was found in a breakthrough fraction. No further desorption was observed when the column was cooled to 30°C and washed with the same solution. The adsorbed IgG fraction could be completely desorbed, however, by 0.01 M phosphate buffer (pH 7.5), containing 0.15 M NaCl at 30°C, i.e., in the common conditions of hydrophobic-interaction chromatography. The discrepancy with the earlier results of other researchers [7] may arise from different structures of NIPAA polymeric coatings or different experimental conditions, such as use of a batch operation in the cited study.

Thus, the above experiments provide the conclusion that adsorptions of lysozyme and immunoglobulin G to isopropyl-PA-glass are not strongly influenced by thermal phase transition of the grafted polymer. Temperature-modulated adsorption and desorption of proteins might be possible if an additional ligand, capable of a stronger specific binding, is incorporated into the sorbent together with thermoresponsive polymer. Such a temperature-modulated sorbent was recently proposed for enzyme purification, the desorption step was effectively controlled by a slight shift of temperature [18]. The hydrophobic interactions of proteins with co(NIPAA) seem to be not enough strong and/or selective to control protein adsorption by changing a column temperature in the range of LCST. On the other hand, this study suggests a chromatographic method

for evaluation the free energy of protein interaction with synthetic polymers, which is partially based on the known relationship between  $k'$  and  $\Delta F$  [17], and may be helpful for characterization of new biomaterials and biosorbents.

## References

- [1] M. Heskins, J.E. Guillemt, E. James, J. Macromol. Sci. Chem. A2 (1968) 1441–1455.
- [2] H.G. Schild, D.A. Tirrell, J. Phys. Chem. 94 (1990) 4352–4356.
- [3] S. Hirotsu, J. Phys. Soc. Jpn. 56 (1987) 233–242.
- [4] R. Pelton, X. Wu, W. McPhee and K.C. Tam, in J.W. Goodwin and R. Buscall (Editors), Colloidal Polymer Particles, Academic Press, London, 1995, p. 81–99.
- [5] Z. Ding, G. Chen, A.S. Hoffman, BioConjugate Chem. 7 (1996) 121–125.
- [6] H. Kawaguchi, K. Fujimoto, Y. Mizubara, Colloid Polym. Sci. 270 (1992) 53–63.
- [7] H. Yoshioka, M. Mikami, T. Nakai, Y. Mori, Polym. Adv. Technol. 6 (1995) 418–420.
- [8] T. Takezawa, Y. Mori, K. Yoshizato, Biotechnology 8 (1990) 854–858.
- [9] M. Morra, C. Cassinelli, Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.) 36 (1995) 55–56.
- [10] M. Gewehr, K. Nakamura, N. Ise, H. Kitano, Makromol. Chem. 193 (1992) 249–256.
- [11] A.E. Ivanov, S.V. Belov, V.P. Zubov, Polymer Sci. 36 (1994) 276–280.
- [12] A.E. Ivanov, L.S. Zhigis, E.M. Rapoport, O.E. Lisutina, V.P. Zubov, J. Chromatogr. B 664 (1995) 219–223.
- [13] Y.G. Takei, T. Aoki, K. Sanui, N. Ogata, T. Okano, Y. Sakurai, Trans. Mater. Res. Soc. Jpn. 15A (1994) 25–28.
- [14] S.-L. Wu, K. Benedek, B.L. Karger, J. Chromatogr. 359 (1986) 3–17.
- [15] Z. El Rassi, Cs. Horváth, J. Liq. Chromatogr. 9 (1986) 3245–3268.
- [16] R.P.W. Scott, Technique and Practice of Chromatography, (Chromatographic Science Series, Vol. 70) Marcel Dekker, New York, Basel, 1994, pp. 34–35.
- [17] D.R. Absolom, R.A. Barford, Anal. Chem. 60 (1988) 210–212.
- [18] I.Yu. Galaev, C. Warrol, B. Mattiasson, J. Chromatogr. A 684 (1994) 37–43.

**THIS PAGE BLANK (USP)**

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 P98-084	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/02690	国際出願日 (日.月.年) 21.05.99	優先日 (日.月.年) 29.05.98
出願人(氏名又は名称) 花王株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は

☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 1 図とする。 ☒ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl.<sup>8</sup> A46B5/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> A46B 1/00-17/08, A46D 1/00-9/06,  
A45D19/00-20/52, B29C45/00-45/24,  
B29C45/46-45/63, B29C45/70-45/72,

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1996年  
日本国公開実用新案公報 1971-1999年  
日本国登録実用新案公報 1994-1999年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P, 10-085044, A (加藤憲三) 7. 4月. 1998 (07. 04. 98) (ファミリーなし)	1, 5
Y	J P, 62-69910, U (富倉正) 2. 5月. 1987 (0 2. 05. 87) (ファミリーなし)	1, 5
Y	J P, 8-27700, A (ソニー株式会社) 30. 1月. 199 6 (30. 01. 96) (ファミリーなし)	5
Y	J P, 6-278160, A (中山工業株式会社) 4. 10月. 1 994 (04. 10. 94) (ファミリーなし)	5

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06. 07. 99

国際調査報告の発送日

15.06.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

和重子 告明

3 R

9028

電話番号 03-3581-1101 内線 3346

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

B. 調査を行った分野  
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
B29C45/74-45/84, B65D57/00-59/08,  
B65D81/00-81/16

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 08 OCT 1999

WIPO PCT

9/12 596

出願人又は代理人 P98-084 の書類記号	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P99/02690	国際出願日 (日.月.年) 21.05.99	優先日 (日.月.年) 29.05.98
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. <sup>8</sup> A46B5/04		
出願人 (氏名又は名称) 花王株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。	
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>3</u> ページからなる。	
<input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で <u>          </u> ページである。	
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。	
I	<input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎
II	<input type="checkbox"/> 優先権
III	<input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不成
IV	<input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如
V	<input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
VI	<input type="checkbox"/> ある種の引用文献
VII	<input type="checkbox"/> 国際出願の不備
VIII	<input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 02.07.99	国際予備審査報告を作成した日 24.09.99	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)  種子 浩明 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3386	3 R 9028

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1-10

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲 6-10

有

請求の範囲 1-5

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲 1-10

有

請求の範囲

無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

1. 文献5: JP, 63-115333, U (正室フレイズ株式会社) 25. 7月1988(25. 07. 88) (ファミリーなし) / 請求の範囲1に記載された発明は、文献5に記載されたものから、単に当該技術分野の専門家が明白に又は論理的に導くことができないもの、すなわち当該技術分野の専門家の予測を越えたものである場合とは認められない。

2. ブラシの技術分野において、ブラシの突起の最大圧縮荷重、ブラシの突起の高さ及びブラシの突起の先端部の曲率半径を適宜選択して決定することは、本願出願前慣用の技術であり、上記文献5に記載されたものに、上記本願出願前慣用の技術を適用して、ブラシの突起の最大圧縮荷重、ブラシの突起の高さ及びブラシの突起の先端部の曲率半径を適宜選択決定し、請求の範囲2-4に記載された発明となすことは、単に当該技術分野の専門家が明白に又は論理的に導くことができないもの、すなわち当該技術分野の専門家の予測を越えたものである場合とは認められない。

3. パルプの成形体の技術分野において、パルプモールド法は、本願出願前周知の技術(国際調査報告で引用された文献3及び4)であるから、請求の範囲5に記載された発明は、単に上記文献5に記載されたもの並びに本願出願前慣用の技術及び上記本願出願前周知の技術から、当該技術分野の専門家が明白に又は論理的に導くことができないもの、すなわち当該技術分野の専門家の予測を越えたものである場合とは認められない。

4. 請求の範囲6-10に記載された発明は、国際調査報告書に引用されたいずれの文献にも記載されておらず、かつ当業者にとって自明のものでもない。

加えて、請求の範囲6-10に記載された発明は、基準日に当該技術分野の専門家にとって、技術の発展からみて当然考えられる技術水準を越えたものである。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 YCT-424	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/02698	国際出願日 (日.月.年) 24.05.99	優先日 (日.月.年) 22.05.98
出願人(氏名又は名称) 岡野 光夫		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は

☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☒ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> G01N30/48Int. Cl<sup>6</sup> G01N30/54

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> G01N30/48Int. Cl<sup>6</sup> G01N30/54

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1999年

日本国公開実用新案公報 1971-1999年

日本国登録実用新案公報 1994-1999年

日本国実用新案登録公報 1996-1999年

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 7-318551, A(新技術事業団), 8. 12月. 1995 (08. 12. 95), (ファミリー無し)	1-14
X	JP, 8-103653, A(テルモ株式会社), 23. 4月. 1996 (23. 04. 96), (ファミリー無し)	1-14
X	JP, 9- 49830, A(テルモ株式会社), 18. 2月. 1997 (18. 02. 97), (ファミリー無し)	1-14
X	JP, 6-262071, A(三菱化成株式会社), 20. 9月. 1994 (20. 09. 94), (ファミリー無し)	1-7, 12-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04. 06. 99

国際調査報告の発送日

5.06.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

宮澤 浩



2 J

9407

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 7- 5161, A(平山忠一), 10. 1月. 1995(10. 01. 95), (ファミリー無し)	1-5, 12, 13
X	Analytical Chemistry, <u>69</u> (1997), p. 823-830	1-7, 12-14
X	Analytical Chemistry, <u>68</u> (1996), p. 100-105	1-7, 12-14
A	Journal of Chromatography A, <u>776</u> (1997), p. 75-80	1-14

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07318551 A**(43) Date of publication of application: **08.12.95**

(51) Int. Cl.

**G01N 30/48****C08L 33/26****G01N 30/88**(21) Application number: **06108643**(22) Date of filing: **23.05.94**(71) Applicant: **RES DEV CORP OF JAPAN**

(72) Inventor: **MATSUSHIMA YOSHIKAZU**  
**KANAZAWA HIDEKO**  
**YAMAMOTO KAZUO**  
**TAKAI SHINJI**  
**SAKURAI YASUHISA**  
**OKANO MITSUO**

(54) **CHROMATOGRAPHY AND FILLER THEREFOR**

## (57) Abstract:

**PURPOSE:** To realize separation and recovery while sustaining the function of biological element in the mobile phase of single water system by employing a filler wherein the balance of hydrophilicity and hydrophobicity on the surface of fixed phase can be varied depending on the temperature while fixing the mobile phase to the water system.

**CONSTITUTION:** The filler being employed in the separation of solute, e.g. a biological element or a cell, includes a filler where the balance of hydrophilicity and hydrophobicity on the surface of fixed phase can be varied by an external signal, e.g. temperature variation, while fixing the mobile phase to the water system, e.g. a filler where the surface of a carrier having amino group, carboxyl group, hydroxy group, etc., on the surface is chemically modified with polyalkyl acryl amide having an amino group at the end or a copolymer thereof. When such filler is employed, a biological element is adsorbed to the hydrophobic surface upon reaching a critical

temperature and it is separated or exfoliated as the temperature drops. Consequently, an organic solvent, a surfactant, etc., does not act as a dirt and the inventive method can be utilized in the separation, as well as analysis, while sustaining the function of protein or cell.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 30/48		S		
C 0 8 L 33/26	L J V			
G 0 1 N 30/88		E		

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平6-108643

(22) 出願日 平成6年(1994)5月23日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成6年3月5日  
 社団法人日本薬学会発行の「日本薬学会第114年会講演  
 要旨集」に発表

(71) 出願人 390014535

新技術事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 松島 美一

神奈川県川崎市川崎区池田2-3-21

(72) 発明者 金澤 秀子

神奈川県横浜市緑区奈良町2913-1-1107

(72) 発明者 山本 一夫

東京都板橋区志村1-24-11-101

(72) 発明者 高井 信治

東京都目黒区中根1-9-14

(74) 代理人 弁理士 田中 宏

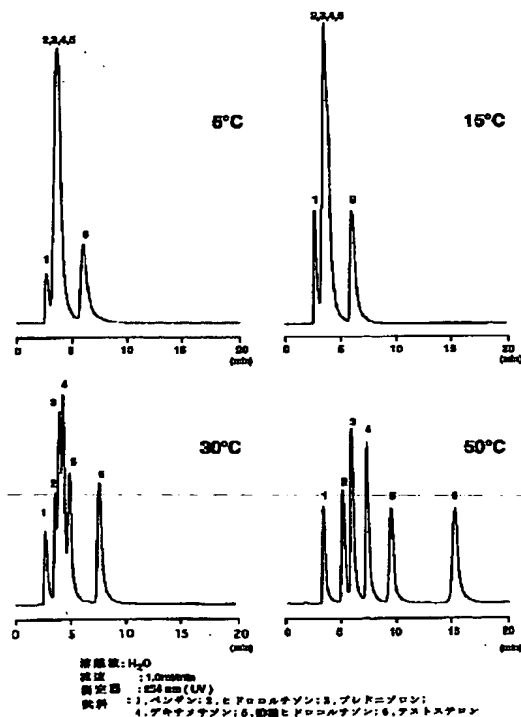
最終頁に続く

## (54) 【発明の名称】 クロマトグラフィー方法及び該方法に使用するクロマトグラフィー用充填剤

## (57) 【要約】

【目的】水系で生体要素（タンパク質、DNA、糖脂質等）及び細胞を固体表面との相互作用を外的信号（例えば温度）によって制御し、分離あるいは精製することができるクロマトグラフィー用充填剤を使用したクロマトグラフィー方法提供することを目的とする。

【構成】移動相を水系に固定したままで、固定相表面の親水性／疎水性のバランスを外的信号によって変化させることが可能である充填剤を用いて溶質の分離を行うことを特徴とするクロマトグラフィー方法であり、具体的には、アミノ基、カルボキシル基、或いは水酸基等を表面に持つ担体表面を、末端にアミノ基、カルボキシル基、或いは水酸基等を有するポリアルキルアクリルアミド或いはその共重合体で化学修飾したクロマトグラフィー用充填剤を用いたクロマトグラフィー方法である。



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 移動相を水系に固定したままで、固定相表面の親水性／疎水性のバランスを外的信号によって変化させることが可能である充填剤を用いて溶質の分離を行うことを特徴とするクロマトグラフィー方法。

【請求項2】 外的信号が温度変化である請求項1記載のクロマトグラフィー方法。

【請求項3】 溶質が生体要素もしくは細胞である請求項1記載のクロマトグラフィー方法。

【請求項4】 充填剤が、担体表面を末端にアミノ基、カルボキシル基、或いは水酸基等を有するポリアルキルアクリルアミド或いはその共重合体で化学修飾したクロマトグラフィー用充填剤である請求項1記載のクロマトグラフィー方法。

【請求項5】 アミノ基、カルボキシル基、或いは水酸基等を表面に持つ担体に、末端にアミノ基、カルボキシル基、或いは水酸基等を有するポリアルキルアクリルアミド或いはその共重合体で化学修飾したクロマトグラフィー用充填剤よりなる固定相に溶質を保持させた後、外部温度を段階的に変化させる温度グラディエント或いは温度によるステップグラディエント法により固定相表面の親水性／疎水性のバランスを変化させ、同一の移動相を通過させることによって溶質を分離することを特徴とするクロマトグラフィー方法。

【請求項6】 移動相が水系溶媒である請求項5記載のクロマトグラフィー方法。

【請求項7】 担体表面に、温度応答性高分子を導入したことを特徴とするクロマトグラフィー用充填剤。

【請求項8】 温度応答性高分子が末端にアミノ基、カルボキシル基、或いは水酸基等を有するポリアルキルアクリルアミドである請求項7記載のクロマトグラフィー用充填剤。

【請求項9】 ポリアルキルアクリルアミドが、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）、ポリジエチルアクリルアミド又はポリアクリロイルピロイジンの何れか一種である請求項8記載のクロマトグラフィー用充填剤。

【請求項10】 アミノ基、カルボキシル基、或いは水酸基等を有する担体表面にアミノ基、カルボキシル基、或いは水酸基等を有するポリアルキルアクリルアミド或いはその共重合体を化学修飾したことを特徴とするクロマトグラフィー用充填剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は水系で、生体要素（タンパク質、DNA、糖脂質等）及び細胞を固体表面と細胞膜との相互作用を外的信号（例えば温度）によって制御することが可能であるクロマトグラフィー用充填剤を利用して分離或いは精製することができるクロマトグラフィー方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は移動相液体と固定相の組合せが多様であり、試料に応じて種々選択できるので近年種々の物質の分離、精製に利用されている。しかし、従来使用されているクロマトグラフィーでは固定相の表面構造は変化せず、移動相中に含まれている溶質と固定相表面との相互作用を移動相の溶媒を変化させることによって行われている。例えば、多くの分野で使用されているHPLCにおいては、固定相としてシリカゲル等の担体を用いた順相系のカラムではヘキサン、アセトニトリル、クロロホルムなどの有機溶媒を移動相として使用しており、また水系で分離されるシリカゲル誘導体を担体として用いた逆相系のカラムではメタノール、アセトニトリルなどの有機溶媒が使用されている。

10

20

【0003】 また、陰イオン交換体あるいは陽イオン交換体を固定相とするイオン交換クロマトグラフィーでは外的イオン濃度あるいは種類を変化させて物質分離を行っている。近年遺伝子工学等の急速な進歩により、生理活性ペプチド、タンパク質、DNAなどが医薬品を含む様々な分野に広範囲にその利用が期待され、その分離・精製は極めて重要な課題となっている。特に、生理活性物質をその活性を損なうことなく分離・精製する技術の必要性が増大している。

30

【0004】 しかし、従来の移動相に用いられている有機溶媒、酸、アルカリ、界面活性剤は生理活性物質の活性を損なうと同時に夾雑物となるために、そのシステムの改良が期待されている。また、このような物質の環境汚染の回避という面からもこれらの物質を用いない分離・精製システムが必要となっている。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】 そこで、本発明者らは、上記の要望を満足すべく種々検討した結果、固定相の表面構造を、例えば温度などの外的条件を変化させることによって、移動相を変化させることなく溶質と固定相表面との相互作用を変化させることにより分離・精製する技術を開発し、本発明を完成したもので、本発明の目的は、外的条件を変化させることによって固定相の表面特性を可逆的に変化させ、これによって単一の水系移動相によって分離、精製可能なクロマトグラフィー方法及び該クロマトグラフィーに使用する固定相としての充填剤を提供する。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明の要旨は、移動相を水系に固定したままで、固定相表面の親水性／疎水性のバランスを外的信号によって変化させることが可能である充填剤を用いて溶質の分離を行うことを特徴とするクロマトグラフィー方法であり、具体的には、アミノ基、カルボキシル基、或いは水酸基等を表面に持つ担体表面を、末端にアミノ基、カルボキシル基、或いは水酸

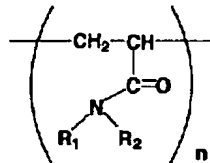
50


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

基等を有するポリアルキルアクリルアミド或いはその共重合体で化学修飾したクロマトグラフィー用充填剤を用いたクロマトグラフィー方法である。即ち、本発明を用いることにより、外部温度を臨界温度以上にすることによってタンパク質や細胞などの生体要素を疎水性表面に吸着させ、温度を低下させることにより、これを分離又は剥離することが可能となる。従って、この際、有機溶媒、酸、アルカリ、界面活性剤等の薬剤を全く用いないので、これらが夾雑物質となることを防ぎ、また、タンパク質や細胞などの機能を維持したままでの分析と同じに分離にも利用することができる。

【0007】従来のクロマトグラフィー法では1種類の移動相で種々の化合物が混じっている試料特に極性の大きく異なる複数の試料を分離・分析する場合、分離が困難であり、分離に要する時間が大変長くなってしまう。そのため、このような試料を扱う際には有機溶媒の量や種類を時間と共に連続的に変化させる溶媒グラディエント法或いは段階的に変化させるステップグラディエント法により分離を行っているが、本発明による温度グラディエント法或いはステップグラディエント法では有機溶媒を使用する代わりに単一の移動相でカラム温度を連続的或いは段階的に変化させることにより同様の分離を達成することが可能であり、この方法を採用することによって、上述の夾雑物の混入を防止し、タンパク質や細胞などの機能を維持したまま分離できると共に所望の成分を温度をコントロールすることによって短時間で分離 \*

ポリ-アルキルアクリルアミド



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Abbreviation
Poly( <i>N</i> -isopropylacrylamide)	—H	—CH <sub>2</sub> —CH <sub>3</sub>   CH <sub>3</sub>	Poly(IPAAm)
Poly( <i>N,N'</i> -diethylacrylamide)	—C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	—C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Poly(DEAAm)
Poly(acryloylpyrrolidine)			Poly(APy)

【0010】

【化2】

\* が可能なのである。

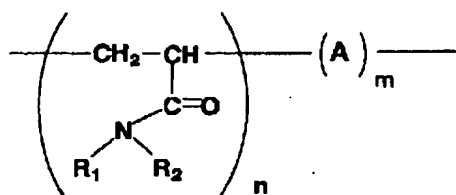
【0008】本発明において使用するクロマトグラフィー用充填剤は、その表面に温度応答性高分子を導入し、これによって充填剤表面の親水性／疎水性のバランスが、例えば温度変化によって変化することが可能な充填剤である。即ち、担体表面を温度応答性高分子である、例えば末端にアミノ基、カルボキシル基、或いは水酸基等を有するポリアルキルアクリルアミド或いはその共重合体で化学修飾した充填剤である。この化学修飾した充填剤としては、例えば、表面にアミノ基、カルボキシル基、或いは水酸基等の官能基を有するシリカ担体に前記のポリアルキルアクリルアミド或いはその共重合体を化学修飾したものである。そして、アミノ基、カルボキシル基、或いは水酸基等の官能基を有するシリカ担体としては、具体的にアミノプロピルシリカゲル、アミノセファデックス、アミノガラス、イオン交換樹脂等を挙げることができる。本発明において、ポリアルキルアクリルアミドとしては、ポリ- (N-イソプロピルアクリルアミド)、ポリジエチルアクリルアミド又はポリアクリロイルピロリジンの何れか一種が好ましい。従って、本願発明において使用する好ましいポリアルキルアクリルアミド及びその共重合体の構造式を示すと次の通りである。

【0009】

【化1】

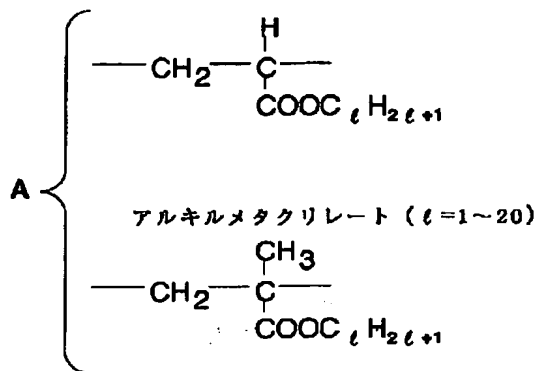
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 共重合体

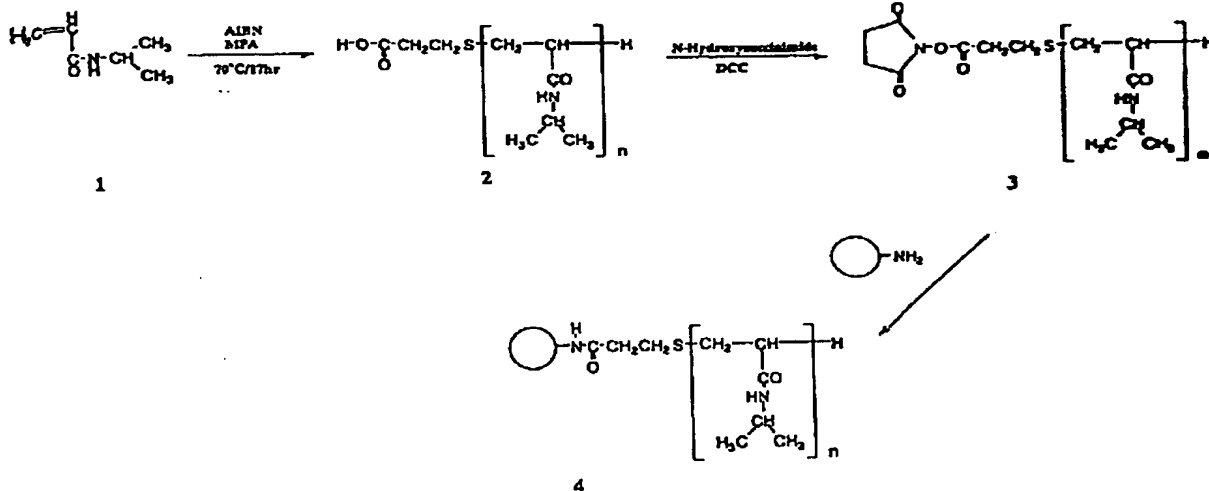


A: 5~60%含有

アルキルアクリレート ( $l=1\sim 20$ )



【0011】ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）は32℃に下限臨界温度を有するので、該分子で化学修飾した担体はこの臨界温度で親水／疎水に表面物性が変化するため、これをクロマトグラフィーの充填剤の表面にグラフトもしくはコーティングして使用した場合、試料に対する保持力が温度によって変化するため溶離液の\*



【0014】N-イソプロピルアクリルアミドモノマー  
(1)、2、2'-アゾビス(イソブチロニトリル)  
(AIBNと略記)、3-メルカプトプロピオン酸(MPAと略記)をN,N-ジメチルホルムアミド溶媒に溶かし、液体窒素を用いて凍結脱気をした後、70±1℃においてテロメリゼーションによって重合した。これを濃縮し、ジエチルエーテルによって沈殿させ片末端にカルボキシル基を持ったポリ(N-イソプロピルアクリル ※50

\* 組成を変化させずに保持挙動を温度によってコントロールすることが可能となる。下限臨界温度を32℃以上にするためには、イソプロピルアクリルアミドよりも親水性のモノマーであるアクリルアミド、メタアクリル酸、アクリル酸、ジメチルアクリルアミド、ビニルピロリドンなどをイソプロピルアクリルアミドと共重合させることによって調整することが可能である。また、下限臨界温度を32℃以下にしたいときは、疎水性モノマーであるスチレン、アルキルメタクリレート、アルキルアクリレートなどとの共重合によって調整することができる。

【0012】また、ポリジethylアクリルアミドの下限臨界温度は、約30℃～32℃であり、この温度を境として親水／疎水に表面物性が変化し、前述のポリー（N-イソプロピルアクリルアミド）の場合と同様に、試料に対する保持力が温度によって調整することができる。本発明で利用される新規なクロマトグラフィー用担体は、化学修飾或いは高分子のコーティングによって作成される。化学修飾手段としては表面グラフト法とラジカル重合の2つの方法を用いることができる。またコーティング方法としては、適用温度範囲内で不溶とした後、不溶なもののコーティングする。これらを図示すると、図1の通りである。本発明のクロマトグラフィー担体の製造方法の具体的手段の一例として次の化学式を参照して述べる。

【0013】

【化3】

※アミド) (2)を得る。粗生成物は溶解再沈法で精製する。これをシリカゲルをいれたデシケーター中に入れ、常圧減圧下にて乾燥する。これを乾燥酢酸エチルに溶解し、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCCと略記)、N-ヒドロキシコハク酸イミドを加え室温で反応させポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) のカルボキシル基を活性エステル化した後、濃縮してジエチルエーテル中に滴下して沈澱させる。次に常圧減圧乾燥し、

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

活性エステル化ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）（3）を得る。これを純水に溶かしアミノ基有担体を加え反応してアミド結合を形成することによりポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）を担体にグラフト、コーティングしたもの（4）を得る。本発明における担体を使用して分離・精製できるものとしては生理活性を有するタンパク質や細胞などで、具体的に牛血清アルブミン、IgG、フィブリノーゲン、フィブロネクチン、トランスフェリン、血液凝固因子等を挙げることができる。

#### 【0015】

【実施例】次に実施例をもって、具体的に本発明を説明する。

##### 実施例1

（a）片末端にカルボキシル基を有するポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）の合成法

N-イソプロピルアクリルアミド20.0g、3-メルカプトプロピオン酸0.19g、2,2'-アゾビス（イソブチロニトリル）0.21gをそれぞれ重合管にいれ、乾燥N、N-ジメチルホルムアミド50mlを加えて溶解した。次に液体窒素下で凍結した後真空オイルポンプで重合管中の酸素を脱気し、減圧状態のまま重合管をメタノールに浸しN、N-ジメチルホルムアミド中の溶存酸素を取り除いた。この凍結脱気の操作を3回繰り返して行った。脱気が完全にできたら70±1℃のインキュベーターで17時間反応させた。次に、室温まで下がったら減圧濃縮を行う乾燥ジエチルエーテル中に滴下させ片末端にカルボキシル基を持ったポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）を沈澱させた。この沈澱物をPTFE（ポリテトラフルオロエチレン）フィルター（ポアサイズ3.0μm）で濾取し、シリカゲルを入れたデシケーター中で減圧乾燥をし、粗生成物18.0gが得られた。これを乾燥N、N'-ジメチルホルムアミド30mlに溶かした後、乾燥ジエチルエーテル中に滴下し、その沈澱物をテフロンフィルターで濾取した。これをデシケーター中で減圧乾燥をおこない精製ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）を得た。N-イソプロピルアクリルアミド8.0g、N、N-ジメチルアクリルアミド2.0g、3-メルカプトプロピオン酸0.18g、N、N'-アゾビスイソブチロニトリル0.1gを精製したN、N-ジメチルアクリルアミド50mlに溶解し、上記と同様に脱気封管後70±1℃で12時間重合した。上記と同様の再沈精製を行い、片末端にカルボキシル基を有するN-イソプロピルアクリルアミド共重合体を得た。得られた共重合体は水溶液中で43℃付近で相転移を示した。合成の仕込み等に、N-イソプロピルアクリルアミドモノマーに対するN、N-ジメチルアクリルアミドモノマーの量を変化させることによって任意の温度で相転移を示す共重合体を得られる。得られた各ポリマーはテトラヒドフランを溶媒としたゲル濾過ク

ロマトグラフィー及び酸-塩基測定によりポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）が分子量10,000、N-イソプロピルアクリルアミド-N、N-ジメチルアクリルアミド共重合体が分子量8,000であり、各分子末端に約1個のカルボキシル基を有することを確認した。

【0016】（b）片末端にカルボキシル基を有するポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）の活性エステル化

10 精製ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）を11.35gを乾燥酢酸エチル100ml中に溶かし、ジシクロヘキシルカルボジイミド1.23g及びN-ヒドロキシコハク酸イミド0.69gを加えてよく攪拌しながら0℃で2時間、室温（20～25℃）で12時間反応させた。次に、副反応物であるN、N'-ジシクロヘキシル尿素をPTFEフィルターで濾取し、その濾液を減圧濃縮した後乾燥ジエチルエーテル中に滴下し沈澱したものをテフロンフィルターで濾取して、常温減圧で溶媒を留去したものについて、活性エステル化ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）を得た。片末端カルボン酸N-イソプロピルアクリルアミド-N、N-ジメチルアクリルアミド共重合体も同様にして、活性エステル化した。

【0017】（c）活性エステル化ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）とアミノ基担体との結合

活性エステル化ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）2.0gを純水50mlに溶かし、アミノプロピルシリカゲル6.0gを加え、12時間室温で激しく振とうして反応させた後冷水500mlで洗浄し、再び活性エステル化ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）2.0gを純水50mlに溶かした溶液に加え、12時間室温で激しく振とうした。この操作を3回繰り返して、冷水500mlで洗浄した後、メタノール100mlで洗浄し、乾燥した。活性エステル化ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）3.0gを6mlのN、N-ジメチルホルムアミドに溶解し、これを表面に一級アミノ基を導入したポリスチレン微粒子浮遊液1ml（直径1.0±0.03μm、原液濃度：5×10<sup>10</sup>個/ml）を24mlの純水で希釈した液に1mlづつ30分間隔で加え、ゆっくりと転倒混和した。全量を加えた後、4℃以下で16時間転倒混和した。反応終了後、遠心分離による回収と冷純化による洗浄を2回繰り返した後、ハンクス平衡塩溶液（pH7.4）を用いて希釈した（6×10<sup>9</sup>、6×10<sup>10</sup>/ml）。

【0018】次に本発明の担体を用いてクロマトグラフィーを行った例を示す。

##### 実施例2

（a）空カラムへの充填（湿式スラリー充填法）

ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）修飾シリカゲル2.0gを純水10mlに懸濁し、予め空カラム

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



(4.  $6\phi \times 150\text{mm}$ ) につないであるパッカー内に注ぎ、直ちに蓋を締め圧力が  $350\text{kg}/\text{cm}^2$  で2時間、 $300\text{kg}/\text{cm}^2$  で3時間純水を送液して充填した。

(b) 本発明による充填剤を用いたクロマトグラフィー分離例

上記のポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)修飾シリカゲルを固定相としたカラムに医薬品のヒドロコルチゾン(1)と酢酸ヒドロコルチゾン(2)の混合物を試料として注入した場合の分離例を示す。ヒドロコルチゾン(1)と酢酸ヒドロコルチゾン(2)とを混合した試料を注入し、これを移動相として水を毎分  $1.0\text{ml}$  の割合で流し、紫外可視吸光度検出器(測定波長  $254\text{nm}$ )を用いて測定した。その結果を図2に示す。図2より  $5^\circ\text{C}$ 、 $15^\circ\text{C}$ 、 $30^\circ\text{C}$ 、 $50^\circ\text{C}$ と温度をあげることに、より、水のみ移動相で分離可能となったことが示される。図2はヒドロコルチゾン(1)と酢酸ヒドロコルチゾン(2)の温度変化に伴う保持時間の変化を示した。図3-aは、ベースとなるアミノプロピルシリカゲル担体を充填剤として用いた場合であり、図3-bは本発明を用いた充填剤による分離の場合である。図3における温度の影響を明らかにするために、図4において、 $1/\log k'$ と  $1/T$ の関係をプロットを示す。明らかにベースのシリカゲルや従来のクロマトグラフィーにおける分離とは、全く異なった保持挙動を示している。

【0019】(c) 本発明による充填剤を用いたクロマトグラフィ分離例2

上記のポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)修飾シリカゲルを固定相としたカラムにベンゼン(基準物質)および5種のステロイド医薬品との混合物を試料として注入した場合の分離例を示す。カラムにベンゼン(1)、ヒドロコルチゾン(2)、プレドニゾン(3)、デキサメサゾン(4)、酢酸ヒドロコルチゾン(5)、テストステロン(6)の6種を混合した試料を注入し、これを水を移動相として毎分  $1.0\text{ml}$  の割合で流し、紫外可視吸光度検出器(波長  $254\text{nm}$ )を用いて測定した。その結果を図5に示す。図5において  $50^\circ\text{C}$ では、15分以上であったテストステロンの溶出時間をカラム温度を  $5^\circ\text{C}$ に変化させることにより、6分以内に短縮することができた。このように外部温度をコントロールすることにより自由に試料の溶出時間を変化させることが可能である。また、従来のクロマトグラフィーでは有機溶媒との混合液を移動相に用いなければ分離できなかった試料を  $5^\circ\text{C} \sim 50^\circ\text{C}$ の適当な温度に変化させることにより水のみ移動相によって完全な分離を達成することができた。

\*【0020】(d) 温度応答性高分子修飾表面とリンパ球との温度制御クロマトグラフィー

温度応答性N-イソプロピルアクリルアミド-N, N-ジメチルアクリルアミド共重合体(IPAAm-DM A, 組成20%モル)をグラフトした微粒子をハンクス平衡塩溶液に浮遊させ、ガラスカラム( $8\phi \times 300\text{mm}$ )に高さ  $100\text{mm}$ 程度湿式充填した。ラット腸間膜リンパ節由来のリンパ球浮遊液( $3 \times 10^8\text{cells}/\text{ml}$ )とポリマーグラフト微粒子浮遊液  $1\text{ml}$  ( $6 \times 10^{10}\text{個}/\text{ml}$ )をハンクス平衡塩溶液にて湿潤させたカラム上部に積層した。このカラムを恒温槽中で  $40^\circ\text{C}$ に安定させた後、以下の実験を行った。溶離液として  $40^\circ\text{C}$ に保温したハンクス平衡塩溶液を用いた場合は、カラム下部からの溶出液中には、リンパ球の溶出は見られなかった。続いてカラムを恒温槽中で  $10^\circ\text{C}$ に安定させた後、 $10^\circ\text{C}$ のハンクス平衡塩溶液を溶離液として用いた時、リンパ球は100%溶出した。この溶出液中の生存率を0.2%ニグロシン溶液を用いて観察した結果、カラムから脱離後にリンパ球は100%生存していることが確認された。

【0021】

【発明の効果】以上のように、温度応答性高分子を担体表面に導入した充填剤を固定相として使用することで温度変化による固定相の表面特性の制御が可能となり、水中及び水系によって生理活性物質や生きた細胞の分離・回収やその間に動く相互作用の温度制御が実現され、その結果、単一の水系の移動相によってタンパク質や細胞などの生体要素の機能を維持したままで分離・回収が可能と成るので夾雑物の混入を防止することができた。

30 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の担体表面の説明図

【図2】ヒドロコルチゾン(1)と酢酸ヒドロコルチゾン(2)の溶離に及ぼす温度影響を示す。

【図3】ヒドロコルチゾン(1)と酢酸ヒドロコルチゾン(2)の温度変化に伴う保持時間の変化を示す。a図は充填剤としてアミノプロピルシリカゲル、b図は本発明の充填剤である。

40 【図4】移動相として水を用いた場合、カラム中のヒドロコルチゾン(1)と酢酸ヒドロコルチゾン(2)に対するファントホッフプロット図を示す。a図は充填剤としてアミノプロピルシリカゲル、b図は本発明の充填剤である。

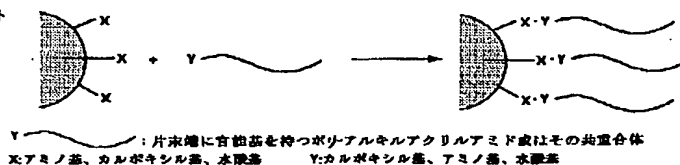
【図5】ベンゼン(1)、ヒドロコルチゾン(2)、プレドニゾン(3)、デキサメサゾン(4)、酢酸ヒドロコルチゾン(5)、テストステロン(6)の溶離に及ぼす温度の影響を示す。

\*

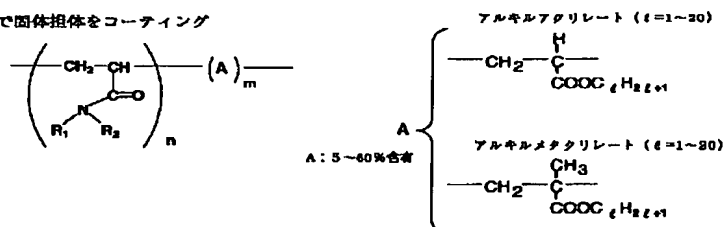
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

【図1】

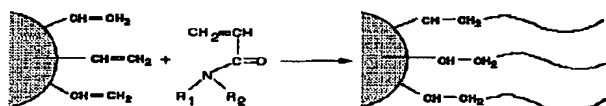
反応式①. 表面グラフト



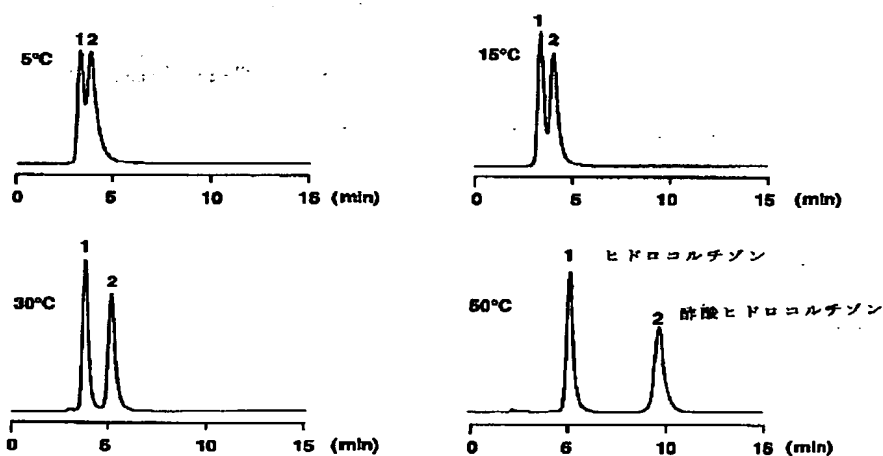
反応式②. 共重合体で固体担体をコーティング



反応式③. ラジカル重合で表面重合した担体



【図2】

溶媒液:  $\text{H}_2\text{O}$ .

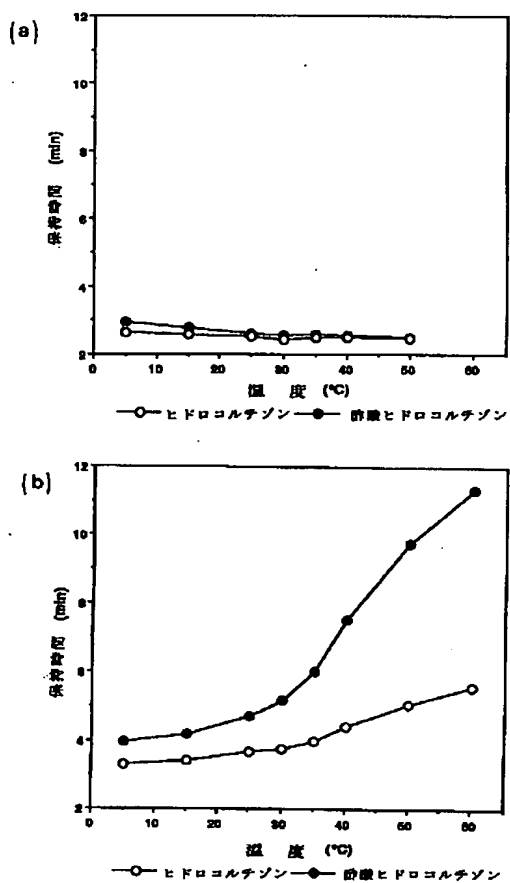
流速: 1.0ml/min.

測定器: 254nm(UV).

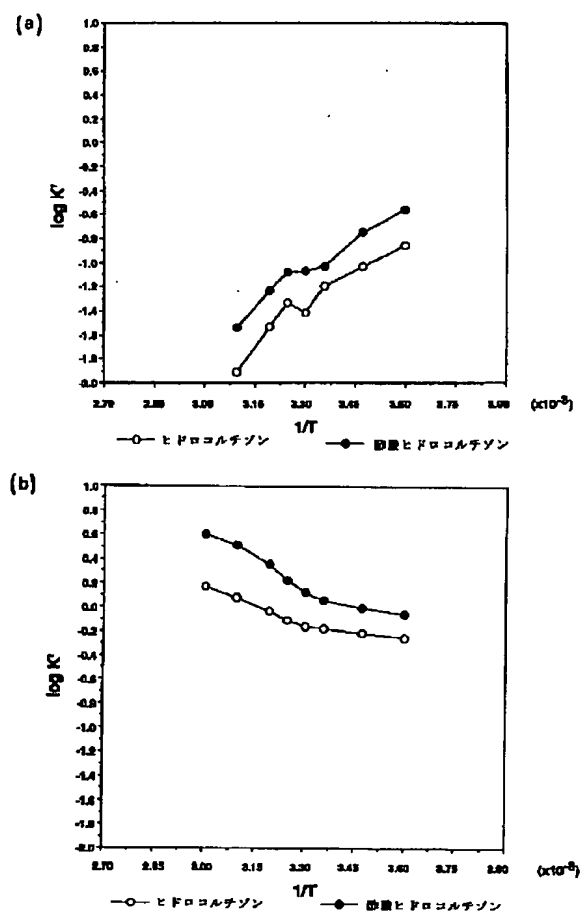
試料: ヒドロコルチゾン, 酢酸ヒドロコルチゾン

**THIS PAGE BLANK (USPTL**

【図3】



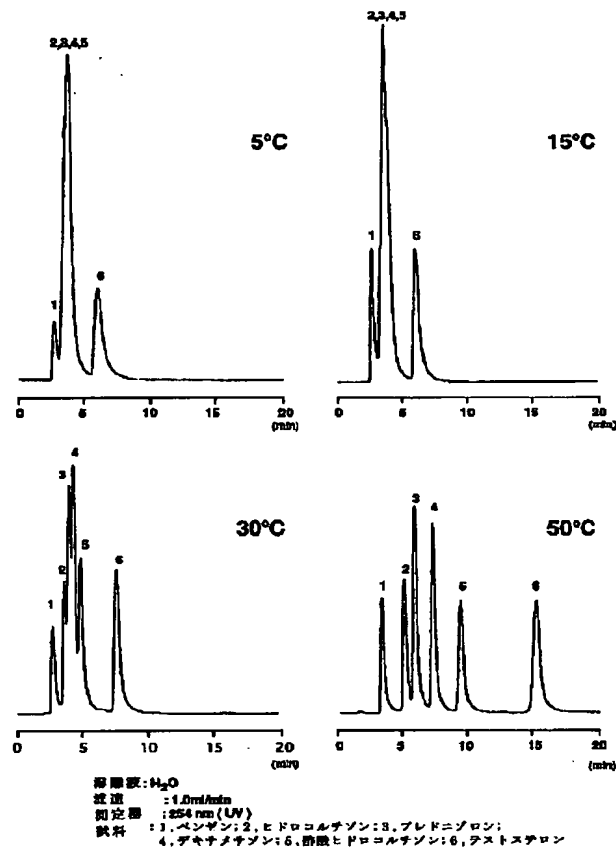
【図4】





**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

【図5】



フロントページの続き

(72)発明者 桜井 靖久  
 東京都杉並区永福 3-17-6

(72)発明者 岡野 光夫  
 千葉県市川市国府台 6-12-12

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09049830 A**

(43) Date of publication of application: **18.02.97**

(51) Int. Cl

**G01N 30/88  
B01D 15/08  
B01J 20/26  
G01N 30/48  
G01N 33/543  
// B01D 61/14  
C12M 1/00**

(21) Application number: **07203378**

(22) Date of filing: **09.08.95**

(71) Applicant: **TERUMO CORP**

(72) Inventor: **ONISHI MASATO  
MOTOMURA TADAHIRO**

**(54) STIMULUS RESPONDING TYPE SEPARATING  
MATERIAL AND SEPARATING AND REFINING  
METHOD**

(57) Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a separating material which has a high specificity to a target material and can easily recover the target material by forming a domain composed of stimulus responding high molecular chains and another domain having an affinity to the target material on the surface of a base material and a separating system.

**SOLUTION:** A separating material has a domain composed of stimulus responding high molecular chains and another domain having an affinity to a target material on the surface of its base material. The stimulus responding type high molecule can be a graft copolymer, a alternating copolymer, or a random copolymer. It is preferable to select a suitable copolymer out of the copolymers by taking the nature of a target cell to be separated and the magnitude of the structural change of the copolymer caused by the stimulus response into consideration. The most suitable target material is a cell. When phase separation occurs on the surface of the

base material, the capping phenomenon which is often observed when cells are adsorbed to the surface of a separating material is avoided and the cells are softly adsorbed to the surface, because ligands unevenly exist when viewed microscopically in accordance the phase separating structure.

**COPYRIGHT: (C)1997,JPO**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-49830

(43) 公開日 平成9年(1997)2月18日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 30/88			G 0 1 N 30/88	E
B 0 1 D 15/08			B 0 1 D 15/08	
B 0 1 J 20/26			B 0 1 J 20/26	H
G 0 1 N 30/48			G 0 1 N 30/48	R
33/543	5 2 1		33/543	5 2 1
審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 8 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平7-203378

(22) 出願日 平成7年(1995)8月9日

(71) 出願人 000109543

テルモ株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号

(72) 発明者 大西 誠人

神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地

テルモ株式会社内

(72) 発明者 本村 忠広

神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地

テルモ株式会社内

(54) 【発明の名称】 刺激応答型分離材料および分離精製方法

(57) 【要約】

【課題】 標的物質に対する高い特異性を有し、標的物質を簡便に回収できる分離材料及び分離システムを提供することを目的とする。

【解決手段】 標的物質に対して親和性を有する領域と刺激応答性高分子鎖よりなる領域とを基材表面に有する。

**THIS PAGE BLANK (USP)**

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】刺激応答性高分子鎖よりなる領域と標的物質に対して親和性を有する領域とを基材表面に有することを特徴とする刺激応答型分離材料。

【請求項2】刺激応答性領域よりなる分子鎖と標的物質に対して親和性を有する分子鎖とを有する共重合体を基材表面に有することを特徴とする請求項1に記載の刺激応答型分離材料。

【請求項3】刺激応答性高分子鎖よりなる領域と標的物質に対して親和性を有する領域とを基材表面に有する刺激応答型分離材料において、前記基材が多孔質体からなることを特徴とする刺激応答型分離材料。

【請求項4】刺激応答性高分子鎖よりなる領域と標的物質に対して親和性を有する領域とを基材表面に有する刺激応答型分離材料を用いて、標的物質を該分離材料に吸着させた後、該刺激応答性高分子鎖の高次構造を変化させることにより、標的物質を該分離材料より脱離させることを特徴とする物質の分離精製方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、標的物質に対して特異的親和性を有する物質と刺激応答性高分子とを利用した新規な分離材料、その製造方法及び分離方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】近年、細胞工学や遺伝子工学等の発展に伴い、細胞や遺伝子を利用した細胞治療や遺伝子治療の研究が盛んとなっており、目的とした細胞や生体物質を損傷させることなく分離する技術が重要となっている。また、バイオテクノロジーの発展により、生物工学的手法によるペプチド、蛋白質、糖蛋白質といった生理活性分子の生産が行われるようになってきており、細胞やバイオプロダクツの簡便で損傷の少ない分離精製技術が望まれている。

【0003】従来より化学工業分野で使用されている吸着・分配・蒸留・析出といった分離・精製の単位操作では、熱や有機溶媒の添加等により、被精製物質に対して大幅な環境変化を強いるため、前述の細胞やバイオプロダクツの分離には適していないことが多い。

【0004】細胞やバイオプロダクツの分離方法として、体積（分子量）や密度による方法（沈降速度法、密度勾配遠心法、ゲル濾過法等）、電場中での移動度の差による方法（電気泳動等）、等電点による方法（焦点電気泳動など）、2液相間への分配による方法（2層分配法、分配クロマトグラフィー）、固相への吸着性の差による方法（吸着クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー）等が知られている。

【0005】これらの分離方法の多くは、物理化学的性状が大きく異なる細胞成分の分離には適用できるものの、物理化学的性状が良く似た成分や細胞、例えばリン

パ球亜集団の分離などには適用が困難であった。この中で標的物質に対する選択性の高い方法は、アフィニティークロマトグラフィーであり、近年広く利用されるようになってきている。細胞を対象とするアフィニティークロマトグラフィーとしては、標的細胞の表層に存在する膜蛋白質等に対するモノクローナル抗体を結合したビーズやシャーレを用いた分離方法が報告されており、本方法による各種リンパ球の亜集団分離も報告されている

（例えば、ジャーナル・オブ・イミュノロジカル・メソッド、第54号、251ページ、1983年に記載されているブラウンらの研究報告）。この抗体を用いた方法は、特異性が極めて高いことが利点であるが、欠点として、吸着した細胞の脱着が困難なこと、抗体が細胞表層の抗原に結合するための時間（接触時間）を長くする必要があり、その結果、非特異的な吸着が増加すること、等があった。

【0006】前述の欠点を改良した方法としては、アビジン-ビオチンのような親和性の高い結合を利用して、短時間で分離材料に吸着させる方法がWO91/16116で提案されている。すなわち、ビオチンで標識した抗体を予め時間をかけて標的細胞に結合させた後、アビジンを結合した分離材料に吸着させることにより、短時間で効率良く標的細胞を分離できることとなる。しかしながら、この方法では、物理的振動を用いて抗体と標的細胞の結合やアビジンとビオチンとの結合を解離することにより標的細胞の回収が行われているため、ビーズ同士衝突等による細胞の損傷や機能低下が免れない。

【0007】細胞機能を損なわないように回収する方法としては、特開平2-211865号に記載された水に対する上限または下限臨界溶解温度が0～80℃にあるポリマーもしくはコポリマーで表面を被覆した細胞培養基材が報告されている。この方法は、温度により疎水性-親水性と相転移する温度応答性高分子を利用したものであり、温度応答性高分子が疎水性で収縮した状態の時に細胞を吸着させた後、温度を変化させ、親水性となって膨潤する時に吸着した細胞を脱着させる方法である。この方法の欠点は、細胞に対する特異性が低いため、種々の細胞が存在する液体から特定の細胞を回収することができないことである。特に、マクロファージ、白血球、リンパ球等の多くは、曲率の小さい表面に吸着することが知られており、フィルターや不織布形状に加工したこの分離材料を用いて、特定のリンパ球などを選択的に回収することは不可能であった。

## 【0008】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明は、標的物質に対する高い特異性を有し、標的物質を簡便に回収できる分離材料及び分離システムを提供することを目的とする。

## 【0009】

【課題を解決するための手段】上記発明の目的は以下の

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

刺激応答型分離材料及びその製造方法によって達成される。

(1) 刺激応答性高分子鎖よりなる領域と標的物質に対して親和性を有する領域とを基材表面に有することを特徴とする刺激応答型分離材料。

(2) 刺激応答性領域よりなる分子鎖と標的物質に対して親和性を有する分子鎖とを有する共重合体を基材表面に有することを特徴とする(1)に記載の刺激応答型分離材料。

(3) 刺激応答性高分子鎖よりなる領域と標的物質に対して親和性を有する領域とを基材表面に有する刺激応答型分離材料において、前記基材が多孔質体からなることを特徴とする刺激応答型分離材料。

(4) 刺激応答性高分子鎖よりなる領域と標的物質に対して親和性を有する領域とを基材表面に有する刺激応答型分離材料を用いて、標的物質を該分離材料に吸着させた後、該刺激応答性高分子鎖の高次構造を変化させることにより、標的物質を該分離材料より脱離させることを特徴とする物質の分離精製方法。

#### 【0010】

【発明の実施の形態】本発明においては、標的物質は特に限定されず、蛋白質、糖蛋白質、核酸、細胞、人工細胞、合成高分子化合物等を例示できる。本発明の分離材料は、刺激応答性高分子鎖と標的物質に対して親和性を有する領域よりなる領域とを基材表面に有する材料であり、特に表面状態は限定されないが、基材表面が相分離していることが好ましい。この時、標的物質に対して親和性を有する分子(リガンド)が、相分離構造に従ってミクロ的に不均一に存在するが、その際、標的物質の大きさが該標的物質に対して親和性を有する領域の大きさより小さいことが好ましい。相分離構造を基材表面に形成させる方法としては、刺激応答性高分子にブロック共重合体を用いる方法が好ましい。一般に、高分子間では相溶性を示すものもあるが、多くの高分子は相分離を起こすことが知られている。特に、ブロック共重合体は、海島状、縞状、ラメラ状に規則的なミクロ相分離構造を発現することが知られており、このような構造が本発明の分離材料として好ましい。

【0011】また、刺激応答性高分子の構造としては、グラフト共重合体、交互共重合体もしくはランダム共重合体でもかまわない。これらの共重合体は、分離する標的細胞の性質と共重合体の刺激応答による構造変化の大きさを考慮して選択するのが好ましい。基材表面における標的物質の親和性領域の比率は、外部環境により異なるため明確に規定できないが、標的物質を吸着する時に、10～90%、好ましくは、20～80%である。

【0012】標的物質としては、細胞を好適に例示できる。ここで、基材表面が相分離している場合、リガンドが、相分離構造に従ってミクロ的に不均一に存在しているため、細胞が分離材料表面に吸着されるときにしばし

ば観察されるキャッピング現象が回避されソフトに吸着することとなる。そのため、細胞の損傷が少なくなり、吸着した細胞の機能を発現させる場合や分離精製(回収)する場合に、優れた性能を発現することとなる。また、標的とする細胞は限定されず、例えば、上皮系細胞、肝実質細胞、膵ラ島細胞、マクロファージ、単核球、クッパー細胞、ラ島細胞、NK細胞(CD56<sup>+</sup>)、血小板、血液幹細胞等の未分化細胞(CD34<sup>+</sup>)、Bリンパ球、Tリンパ球、及びそのサブセット(CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD19<sup>+</sup>、CD71<sup>+</sup>、IL2R<sup>+</sup>等)、各種の腫瘍細胞や機能細胞等より、目的に応じて選定される。

【0013】刺激応答性高分子としては、熱、pH、電位、光等により高次構造が変化して、水溶液中で膨潤したり収縮する高分子であればよい。例えば、水に対する上限臨界温度または下限臨界温度を有し、温度変化にตอบสนองして、膨潤-収縮する高分子を好適に例示できる。そのような高分子としては、N-イソプロピルアクリルアミドやN,N-ジエチルアクリルアミド、N-イソプロピルメタアクリルアミドなどのアクリルアミドやメタアクリルアミドの誘導体類をはじめ、ビニルメチルエーテルなどのビニルエーテル類等のポリマーやコポリマーを例示できる。

【0014】また、光により構造変化させる場合は、例えば、アゾベンゼン基を有する吸水性高分子のように光異性化を起こす高分子、トリフェニルメタンロイコハイドロオキシドのビニル誘導体とアクリルアミド系単量体との共重合体のように光イオン解離する感応基を有する光応答性高分子、スピロベンゾピランを含むN-イソプロピルアクリルアミドゲルのように疎水性相互作用を光制御することにより一定温度領域で光により相転移を生じる光応答性高分子等を用いることができる。

【0015】電気化学的に構造変化を生じさせるには、ビニルフェロセンとN-イソプロピルアクリルアミドとの共重合体のようにフェロセニル基を側鎖に有する電気応答性高分子を例示することができる。フェロセニル基は、還元状態では疎水性の官能基であるが、酸化されると親水性が高まるため、一定の温度領域で電気化学的に膨潤-収縮を制御することができる。

【0016】電気や光により制御できる温度領域は、前記したアルキルアクリルアミドのような温度応答性高分子を形成するモノマーに親水性モノマーや疎水性モノマーを少量共重合させることにより、任意に制御することが可能である。例えば、疎水性モノマーを共重合させると相転移温度は低くなり、親水性モノマーを共重合させると相転移温度は高くなる。

【0017】イオンにより構造変化を誘導したり加速するためには、イオン解離する官能基を有するモノマーを共重合したり、イオンを捕捉する分子を側鎖に導入させてやればよい。例えば、ナトリウムやカリウムを認識す

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



るクラウンエーテル（ベンゾ[18]クラウン-6など）を側鎖に導入したポリN-イソプロピルアクリルアミドは、ナトリウムイオンやカリウムイオンにより相転移が引き起こされる。

【0018】pHやイオン強度等の環境による高分子構造の変化も、細胞機能の損傷が激しくならない条件で利用することができる。pHやイオン強度による構造制御は、カルボキシル基を有するポリアクリル酸やポリメタクリル酸、スルホン酸基を有するポリビニル硫酸やポリスチレンスルホン酸、アミノ基を有するポリビニルアミンやポリビニルアリルアミンといったイオン解離基を有する高分子化合物について適用できる。この場合、静電相互作用による非特異的吸着が起こりやすいので注意しなければならない。

【0019】尚、上記技術を組み合わせることにより、複数の環境変化に応答する高分子を有する刺激応答型分離材料を作製することもできる。

【0020】標的物質に対して親和性を有する領域には、抗原-抗体、酵素-基質（阻害剤）、各種の生理活性物質とそのレセプターとの反応等の生体の制御機構で見られる特異的親和性により標的物質を吸着するリガンドや、静電相互作用、疎水性相互作用、水素結合、ファンデルワールス相互作用等によって標的物質に対して親和性を示す合成化合物やそれらの相互作用を効果的に発現できるよう人工的に設計された分子認識素子等が存在する。

【0021】標的物質に対して親和性を有する領域は、刺激応答性高分子鎖と必ずしも化学的に結合していなくてもよく、ブレンド法や積層法を利用して相分離構造を形成させ、表面に結合されていればよい。また、金属、セラミック、あるいは有機物よりなる直径5μm以下、好ましくは2μm以下の微粉体などを利用して不均一構造を形成させ、該微粉体上に標的物質に対して親和性を有する物質を結合させることも可能である。

【0022】標的物質に対して、親和性を有する領域と刺激応答性高分子鎖を化学的に結合させる方法としては、刺激応答性高分子鎖中に導入された反応性官能基を用いる方法が好ましい。この結合方法は、公知の化学反応を用いた方法で達成できるが、両者の結合の間に、スパーサーや2種以上の化合物よりなる結合が存在していてもよい。結合様式としては、生理的条件下で容易に脱離しないことが望ましいが、必ずしも共有結合である必要はなく、イオンコンプレックスや電荷移動錯体等を利用した結合でもかまわない。また、生理的条件下で高い親和性を有するビオチン-アビジン、ビオチン-ストレプトアビジン、リボフラビン-リボフラビン結合蛋白、プロテインA-IgG、プロテインG-IgG等の生化学的親和性を利用した結合であってもよい。ビオチン-アビジンの組み合わせは、ビオチン標識抗体等が市販されており容易に入手できるため、標的物質に対する抗体をア

ビジンを介して反応性官能基に固定化することができる。

【0023】反応性官能基とは、標的物質に対して親和性を有するリガンドを結合できる官能基であればよく、カルボキシル基、アルデヒド基、アミノ基、イミノ基、スルホン酸基、エポキシ基、イソシアネート基、酸クロリド基、ヒドロキシ基、チオール基、ジスルフィド基等の官能基を例示できる。また、カルボニルジイミダゾール、トシル、トレシル等で活性化されていてもかまわない。これらの官能基を利用して、直接あるいは縮合剤や架橋剤を用いて、標的物質に対するリガンドを結合することが可能である。反応性官能基がエポキシ基のように、直接アミノ基やカルボキシル基と反応するタイプであると反応操作が簡略化できるため好ましい。ヒドロキシ基のように反応性の低い官能基の場合、両末端に反応性の高い官能基を有する架橋剤、例えばポリイソシアネート化合物、ポリエポキシ化合物、ジアルデヒド化合物などを利用してリガンドを固定化することも可能である。

【0024】反応性官能基を有する分子鎖を形成させる方法は、公知の方法でかまわない。例えば、反応性官能基を有する単量体を単独重合したり、他の単量体と共重合することにより反応性官能基を有する分子鎖を形成させる方法や、すでに形成された分子鎖を化学修飾することにより反応性の高い官能基を導入する方法などを例示できる。

【0025】分離材料の基材は、特に限定されないが、多孔質膜、多孔質フィルター等の多孔質体为好ましく、無孔質体でもかまわない。さらに、その形状も特に限定されず、プレート状、シャーレ状、繊維状、不織布状、ビーズ状等を例示でき、それぞれの形状にあったカラムなりモジュールなどに収納されて使用されてもかまわない。

【0026】また、その基材となる材質についても水に対して非溶解性であれば特に限定されず、ポリオレフィン、ハロゲン化ポリオレフィン、ポリウレタン、ポリアミド、ポリエステル、綿、ポリスチレン、及びそれらの変性物や共重合体等、既存の材料を例示することができる。

【0027】本発明の刺激応答性分離材料の製造方法は、限定されず、基材表面に刺激応答性領域よりなる分子鎖と反応性官能基を有する分子鎖とを有するブロック共重合体、グラフト共重合体、交互共重合体もしくはランダム共重合体を主成分とする基材表面を形成させた後、標的物質に対して親和性を有する物質を該共重合体の反応性官能基に固定化させる方法、刺激応答性領域よりなる分子鎖と反応性官能基を有する分子鎖とを有するブロック共重合体、グラフト共重合体、交互共重合体もしくはランダム共重合体に、標的物

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

質に対して親和性を有する物質を該共重合体の反応性官能基に結合させた後、基材表面上に保持させる方法、刺激応答性領域よりなる分子鎖と反応性官能基を有する分子鎖とを有するブロック共重合体、グラフト共重合体、交互共重合体もしくはランダム共重合体と、標的物質に対して親和性を有する物質とを含む溶液を基材表面上に塗布した後、お互いを反応させる方法、等が挙げられる。

【0028】～の場合において、該共重合体もしくは親和性を有する物質の基材表面への導入方法は限定されず、基材の反応性官能基と化学結合させても、基材表面に含浸させるだけでもよい。さらに、グラフト共重合体の場合においては基材表面上に直接、刺激応答性モノマーと反応性官能基を有するモノマーをグラフト共重合してもよい。

【0029】また、基材への刺激応答性領域よりなる高分子鎖と反応性官能基を有する分子鎖とを有するブロック共重合体、グラフト共重合体、交互共重合体もしくはランダム共重合体の保持において、基材表面にあらかじめ反応性官能基を有するモノマーをグラフト重合させておいてもよい。さらに、基材への前記共重合体の保持において刺激応答性領域を有さないポリマーを第三成分として添加してもよい。この第三成分のポリマーとしては、リガンドを結合でき、または反応性官能基を有する分子鎖同士を結合できる官能基を持ったポリマーであれば特に限定されない。

【0030】分離材料に吸着した標的物質の回収は、温度、光、電気等の刺激により刺激応答性高分子の高次構造を急速に変化せしめることにより行う。例えば、刺激応答性領域が収縮した条件下でリガンドが表面に存在する分離材料の場合、この状態で標的物質を吸着させた後、外部刺激により刺激応答性領域を膨潤させることにより、その急激な環境変化を利用して標的物質が材料表面より脱着することとなる。さらに、この回収方法にプロテアーゼ処理等の従来技術を併用しても、相乗効果により短時間での細胞回収が容易になる。

【0031】脱着させた場合の回収率は、固定化したリガンドの種類や状態、刺激応答領域と吸着領域の構造や組成比により異なり、使用条件に応じた条件設定が必要となるが、50%以上、好ましくは80%以上である。

【0032】標的物質と刺激応答性高分子の間に弱い結合が存在する場合、その結合を解離することによって標的物質を脱離させてもかまわない。回収率の向上などを目的として、必要に応じて物理的な方法や化学的な方法を併用してもかまわない。物理的な方法としては、攪拌等が挙げられ、化学的な方法としては加熱／冷却変化、pH変動、イオン強度変化等が挙げられる。

【0033】ここで、基材が多孔質膜の場合、平均孔径が $0.01\mu\text{m}\sim 1\mu\text{m}$ である微多孔質膜であるのが好ましく、さらには平均孔径が $0.02\mu\text{m}\sim 0.8\mu\text{m}$ の

ものであるのが好ましい。平均孔径は、パームポロメーターにより測定された平均孔径であり、原理はASTM-316に記載されている。細胞の大きさは一般に約数 $\mu\text{m}\sim$ 数十 $\mu\text{m}$ のため、前記平均孔径の時、該微多孔質膜を通過することができず、多くの細胞は膜の表面もしくは表層部に捕捉されることとなる。平均孔径が $1\mu\text{m}$ を越える場合や $0.01\mu\text{m}$ より小さい場合は、細胞と基材表面との接触面積が大きくなり、該微多孔質膜を用いる効果が低くなる。さらに、該微多孔質膜を用いる時、その膜厚は、 $5\mu\text{m}\sim 5000\mu\text{m}$ 程度が好ましく、さらに好ましくは $20\mu\text{m}\sim 400\mu\text{m}$ である。ここで、 $5\mu\text{m}$ 以下だと膜強度が弱くなり、 $5000\mu\text{m}$ を越えると体積が増加しモジュールが大きくなり過ぎる。また、その形状は、平膜状であっても中空糸・チューブ状であっても良い。

【0034】該微多孔質膜が非対象膜構造の場合、最表面の平均孔径が細胞より大きくなり、細胞を捕捉する活性層が膜内部に形成されることもありうる。好ましくは、膜の最表面で細胞を捕捉できる膜である。すなわち、白血球が貧食細胞により曲率の大きい繊維の表面に吸着している状態ではなく、微細孔を有する平面上に吸着されていることが望ましい。従って、該微多孔質膜は、網目状、スポンジ状、微粒子状、延伸法により多孔質化されたマイクロフィブリル状の膜構造、微細繊維の集合体状を有することが好ましい。そのような多孔質膜の製造方法は、公知の相分離法により溶液や熔融状態から製膜された。

【0035】さらに、前記のような微多孔質膜の場合は、必ずしも刺激応答性高分子は必要でない。それは、該微多孔質膜の平均孔径が細胞より小さいため、細胞表面は、膜の実質部位と空孔部位とのミクロ的に不均一な表面上に捕捉されていることとなる。すなわち、細胞は、膜表面に結合されたリガンドとミクロ的に不均一に結合しているため、細胞が表面に吸着するときにしばしば観察されるキャッピング現象が回避され、ソフトに吸着することとなる。そのため、細胞の損傷が少なくなり、吸着した細胞の機能が良好に維持されることとなる。細胞吸着部位における実質部位と空孔部位との比率は、空孔部位が20～95%、好ましくは、40～90%である。

【0036】前記微多孔質膜を基材とした場合の細胞回収方法は、該微多孔質膜の一方の側より被処理液を流して標的細胞を吸着せしめた後、細胞回収液を反対側の面より流し、標的細胞を回収する。該微多孔質膜は、平均孔径が細胞の大きさより小さいため、該微多孔質膜を通過せず膜の表層部にトラップされている。そのため、細胞が脱着しやすい方向に圧力をかけることにより、効率良く細胞を回収することが可能となる。プロテアーゼ処理により基材表面から細胞を剥離させる場合、該微多孔質膜は、細胞培養用フラスコのような非多孔性表面と比

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

較して、基材表面との接着部位が少ないため基材表面から細胞を容易に剥離させることが可能である。ここで、該微多孔質膜を用いた場合の標的物質は細胞に限定されない。

【0037】また、前記微多孔質膜は、市販のフィルターホルダーや公知の形態のモジュールに組み込んで使用することが可能である。

#### 【0038】

##### 【実施例】

(実施例1) 標的物質としてCD4<sup>+</sup>細胞(MT-4)を設定し、標的物質に対して特異的親和性を有する物質として抗CD4抗体(Leu-3a)、刺激応答性高分子としてポリ(N,N-ジエチルアクリルアミド)を用いて刺激応答性分離材料を作製し、CD4<sup>+</sup>細胞の分離を検討した。

【0039】主鎖にアゾ基を有するポリ(グリシジルメタクリレート)を重合開始剤として、N,N-ジエチルアクリルアミドをジメチルスルホキシド(DMSO)中で80℃、16時間重合し、石油エーテル中で再沈殿させた後、ポリマーを減圧乾燥させることにより、刺激応答性ドメインとしてポリ(N,N-ジエチルアクリルアミド)、反応性ドメインとしてポリ(グリシジルメタクリレート)を有するブロック共重合体(モル組成比3:1)を得た。

【0040】このブロック共重合体の3wt%ジオキサン溶液を、厚さ100μmのポリウレタンシートにコーティングした。続いて、0.01wt%のポリエチレンイミン(平均分子量12,000)を含む抗CD4抗体の5mg/ml溶液をコーティングした後、38℃で16時間反応させることにより、刺激応答型分離材料を得た。

【0041】この材料に、人新鮮血バフィーコートより1%アルブミン添加リン酸バッファー(PBS)で洗浄して調整した白血球液(1×10<sup>6</sup>/ml)を37℃で接触させることにより、CD4<sup>+</sup>細胞を吸着させた。位相差顕微鏡を用いて、吸着細胞の脱着を観察したところ、1%アルブミンを添加したPBSで25℃でリンスすることにより脱着できることを確認した。

【0042】(実施例2) 1.0wt%のポリメタクリル酸を溶解させたDMSO溶液と、実施例1で作製したブロック共重合体の4wt%DMSO溶液を1:1で混合した後、ポリメタクリル酸を表面グラフト重合したポリエチレンシートにコーティングした後、60℃、40時間反応させた。続いて、5mg/mlの1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(シグマ社製)溶液20ml(pH5.5)をシャーレに注入し、5分間室温で浸漬させた。続いて、抗CD4抗体(Leu-3a)の5mg/ml溶液と接触させて室温で1時間時々攪拌しながら反応させた後、グリシンを最終濃度で0.2モルとなるように添加して1時間放置した後、PBSでリンスすることにより刺激応答型分離材料を作

製した。

【0043】この材料に、人新鮮血バフィーコートより1%アルブミン添加PBSで洗浄して調整した白血球液(1×10<sup>6</sup>/ml)を37℃で接触させることにより、CD4<sup>+</sup>細胞(MT-4)を吸着させた。位相差顕微鏡を用いて、吸着細胞の脱着を観察したところ、1%アルブミンを添加したPBSで25℃でリンスすることにより脱着できることを確認した。

【0044】(実施例3) 主鎖にパーオキシド基を有するグリシジルメタクリレートとメチルアクリレートとの共重合体(モル組成比1:1)を重合開始剤として、N-イソプロピルアクリルアミドをDMSO中で80℃、16時間重合して、刺激応答性ドメインとしてポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)、反応性ドメインとしてポリ(グリシジルメタクリレート-メチルアクリレート共重合体)を有するブロック共重合体(モル組成比4.8:1)を得た。

【0045】0.5wt%の抗CD4抗体(Leu-3a)を含む20%DMSO溶液に上記ブロック共重合体2wt%を含む60%DMSO溶液を1:1で混合した後、ポリメタクリル酸を表面グラフト重合したポリエチレンシートにコーティングし、60℃、40時間反応させた。

【0046】この材料に、人新鮮血バフィーコートより1%アルブミン添加PBSで洗浄して調整した白血球液(1×10<sup>6</sup>/ml)を37℃で接触させることにより、CD4<sup>+</sup>細胞(MT-4)を吸着させた。位相差顕微鏡を用いて、吸着細胞の脱着を観察したところ、1%アルブミンを添加したPBSで25℃でリンスすることにより脱着できることを確認した。

【0047】(実施例4、比較例1) 標的細胞としてCD4<sup>+</sup>細胞(MT-4)、標的細胞に対して特異的親和性を有する物質として抗CD4抗体(Leu-3a)、微多孔質膜としてポリプロピレンを主成分とする微多孔質膜(平均孔径0.14μm、膜厚80μm、表面網目状)を用いて実験を行った。又、比較例1として、未延伸ポリプロピレンフィルム(膜厚60μm)を用いて同様に実験を行った。

【0048】主鎖にアゾ基を有するポリ(グリシジルメタクリレート)を重合開始剤として、メトキシエチルアクリレートをDMSO中で80℃、16時間重合し、イソプロピルエーテル中で再沈殿させた後、ポリマーを減圧乾燥させることにより、メトキシエチルアクリレートとグリシジルメタクリレートのブロック共重合体(モル組成比4.5:1)を得た。

【0049】このブロック共重合体の2wt%テトラヒドロフラン溶液を、ポリプロピレン製微多孔質膜にコーティングした。続いて、0.5wt%のポリエチレンイミン(平均分子量1200)のメタノール/水(1:1)溶液をコーティングした後、60℃で16時間反応させる

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

ことにより、基材表面にポリエチレンイミンを結合した微多孔質膜を得た。続いて、 $20\text{ mg/ml}$ の1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(シグマ社製)溶液 $20\text{ ml}$ ( $\text{pH}4.5$ )をシャーレに注入し、3時間室温で浸漬させた。続いて、抗CD4抗体の $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ 溶液と接触させて $4^\circ\text{C}$ で16時間時々攪拌しながら反応させた後、PBSで洗浄した。

【0050】本材料及び比較例1のフィルムに、人新鮮血バフィーコートより1%アルブミン添加PBSで洗浄して調整した白血球液( $1\times 10^6/\text{ml}$ )を $37^\circ\text{C}$ で接触させて、CD4<sup>+</sup>細胞を吸着させた。細胞の脱着は、EDTA/トリプシン溶液を加えた後、位相差顕微鏡で観察した。微多孔質膜のほうがフィルムと比較して、細胞の脱着が速かった。

【0051】(実施例5, 比較例2) 標的細胞としてCD4<sup>+</sup>細胞(MT-4)、標的細胞に対して特異的親和性を有する物質として抗CD4抗体(Leu-3a)、微多孔質膜としてポリビニリデンフルオライドを主成分とする微多孔質膜(平均孔径 $0.47\text{ }\mu\text{m}$ 、膜厚 $80\text{ }\mu\text{m}$ 、表面スポンジ状)を用いて実験を行った。又、比較例2として、ポリビニリデンフルオライドフィルム(膜厚 $60\text{ }\mu\text{m}$ )を用いて同様に実験を行った。

【0052】主鎖にパーオキサイド基を有するポリ(グリシジルメタクリレート)を重合開始剤として、N-イソプロピルアクリルアミドをDMSO中で $80^\circ\text{C}$ 、16時間重合し、イソプロピルエーテル中で再沈殿させた後、ポリマーを減圧乾燥させることにより、刺激応答性ドメインとしてポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)、反応性ドメインとしてポリ(グリシジルメタクリレート)を有するブロック共重合体(モル組成比3:2:1)を得た。

【0053】このブロック共重合体の2wt%テトラヒドロフラン溶液を、ポリビニリデンフルオライド製微多孔質膜にコーティングした。続いて、0.5wt%のポリエチレンイミン(平均分子量1200)のメタノール/水(1:1)溶液をコーティングした後、 $60^\circ\text{C}$ で16時間反応させることにより、表面にポリエチレンイミンを結合した刺激応答型分離材料を得た。続いて、 $20\text{ mg/ml}$ の1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(シグマ社製)溶液を $20\text{ ml}$ ( $\text{pH}5.5$ )シャーレに注入し、4時間室温で浸漬させた。続いて、抗CD4抗体の $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ 溶液と接触させて $4^\circ\text{C}$ で16時間時々攪拌しながら反応させた後、PBSでリンスした。

【0054】CD4<sup>+</sup>細胞をPRMI1640培地で $1\times 10^6/\text{ml}$ に調製した後、 $37^\circ\text{C}$ で試料と接触させることにより、CD4<sup>+</sup>細胞を吸着させた。 $4^\circ\text{C}$ に冷却したPBSを添加した後、位相差顕微鏡で観察したところ、微多孔質膜では吸着細胞が脱着していたが、フィルムでは部分的に脱着していない細胞が観察された。

【0055】(実施例6, 比較例3) 基材として、ポリウレタン製フィルター(膜厚 $150\text{ }\mu\text{m}$ 、平均孔径 $0.6\text{ }\mu\text{m}$ および $1.4\text{ }\mu\text{m}$ 、表面スポンジ状)を用いて、標的細胞としてCD4<sup>+</sup>細胞(MT-4)、標的細胞に対して特異的親和性を有する物質として抗CD4抗体(Leu-3a)を用いて、実施例5と同様に実験を行った。また、比較例3として無孔性のポリウレタンフィルムを用いて同様に実験を行った。

【0056】脱離回収した細胞数を比較したところ、平均孔径が $0.6\text{ }\mu\text{m}$ のウレタンフィルターが51000個、平均孔径が $1.4\text{ }\mu\text{m}$ のウレタンフィルターが26000個、ウレタンフィルムでは22000個であり、微多孔質膜の優位性が確認された。

【0057】(実施例7) 実施例5の膜を、平膜用モジュール(有効膜面積 $24\text{ cm}^2$ )を用いて評価した。該モジュールは、膜で隔たれた2つの空間を有し、一方の空間に液体流入口と液体流出口があり、もう一方の空間に回収液の流入口がある。

【0058】CD4<sup>+</sup>細胞をPRMI1640培地で $1\times 10^6/\text{ml}$ に調製した後、 $37^\circ\text{C}$ で $2\text{ ml/min}$ の流速で $100\text{ ml}$ 、液体流入口から液体流出口へ流した。細胞の回収は、モジュールを $4^\circ\text{C}$ に冷却後、 $4^\circ\text{C}$ に冷却したPBSを膜の細胞吸着面と反対側より $2\text{ ml/min}$ の流速で $20\text{ ml}$ 流し、液体流出口から収集した。細胞回収率は、63%であった。

【0059】

【発明の効果】本発明の分離材料は、刺激応答性領域と標的物質に対する親和性領域とが存在する。従って、刺激応答性領域における体積変化が大きくなり吸着物質の脱着が起こりやすくなる。また、基材表面に相分離構造を形成させることにより、標的細胞が吸着した場合のキャッピング現象を抑制することができるため、機能損傷の少ない高品質の細胞を回収できることとなる。

【0060】さらに、本発明の刺激応答型分離材料の基材の平均孔径を限定した微多孔質膜で平均孔径が標的物質より小さい時、標的物質は微多孔質膜の実質部位と空孔部位とのミクロ的に不均一な表面上に捕捉されていることとなり、キャッピング現象が回避され、ソフトに吸着することとなる。そのため、細胞の損傷が少なくなり、吸着した細胞の機能が良好に維持されることとなる。さらには、非多孔性表面と比較して基材との接着部位が少ないため、基材から細胞を脱着することが容易となる。

【0061】また、微多孔質膜の時の細胞回収方法は、膜の一方の側より被処理液を流して標的細胞を吸着せしめた後、細胞回収液を反対側の面より流すことにより標的細胞が、微多孔質膜を通過せず、膜の表層部にトラップされているため、細胞が脱着しやすい方向に圧力がかかることにより、効率よく細胞を回収することが可能になる。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



【O Q 6・2】その結果、従来困難であった血球系細胞や機能細胞の分離精製が簡便にできるようになり、本発明の分離材料や技術は、標的細胞の分離、増殖、機能変換等を利用したバイオプロダクツの生産や細胞治療、遺伝 \*

\* 子治療、診断等に効果を発揮することとなる。また、本発明は、医療分野のみならず各種の産業分野において新しい分離技術として効果を発現することとなる。

---

フロントページの続き

(51) Int. Cl. °	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
// B 0 1 D 61/14	5 0 0		B 0 1 D 61/14	5 0 0
C 1 2 M 1/00			C 1 2 M 1/00	A

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08103653 A**(43) Date of publication of application: **23.04.96**

(51) Int. Cl.

**B01J 20/26  
G01N 30/48  
// A61M 1/36  
G01N 33/566**(21) Application number: **06238677**(71) Applicant: **TERUMO CORP**(22) Date of filing: **03.10.94**(72) Inventor: **ONISHI MASATO****(54) STIMULUS RESPONSE TYPE SEPARATING  
MATERIAL AND ITS PRODUCTION****(57) Abstract:**

**PURPOSE:** To provide a stimulus response type separating material which has high specificness to target materials and is capable of easily recovering cells by providing the surface of this material with a region having affinity to the target materials and a region consisting of stimulus responsive high-polymer chains.

**CONSTITUTION:** The surface of this stimulus response type separating material is provided with the region in which artificially designed molecule recognition element, such as control mechanisms of living bodies including reaction of antigen-antibody, enzyme-substrate and various kinds of physiological active materials and their receptors, etc., exist and has affinity with the target materials, such as protein, glycoprotein, nucleic acids, cells, artificial cells and high-polymer compds. The surface is also provided with the region consisting of the stimulus responsive high-polymer chains which are

changed in the higher structure by heat, Hz, potential, light, etc., to the target materials and are swollen and shrunk in an aq. soln. As a result, the capping when the target cells are adsorbed in the material is suppressed and the cells which are less damaged in the functions and have high quality are recovered.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-103653

(43) 公開日 平成8年(1996)4月23日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
B 0 1 J 20/26		H		
G 0 1 N 30/48		R		
// A 6 1 M 1/36	5 4 5			
G 0 1 N 33/566				

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平6-238677

(22) 出願日 平成6年(1994)10月3日

(71) 出願人 000109543

テルモ株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号

(72) 発明者 大西 誠人

神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地

テルモ株式会社内

(54) 【発明の名称】 刺激応答型分離材料及びその製造方法

(57) 【要約】

【目的】 標的物質に対する高い特異性を有し細胞を簡便に回収できる分離材料及び分離システムを提供することを目的とする。

【構成】 標的物質に対して親和性を有する領域と刺激応答性高分子鎖よりなる領域とを表面に有する。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 標的物質に対して親和性を有する領域と刺激応答性高分子鎖よりなる領域とを表面に有する刺激応答型分離材料。

【請求項2】 標的物質に対して親和性を有する分子鎖と刺激応答性領域よりなる分子鎖とを有するブロック共重合体もしくはグラフト共重合体を主成分として構成された表面を有する請求項1の刺激応答型分離材料。

【請求項3】 刺激応答性領域よりなる分子鎖と反応性官能基を有する分子鎖とを有するブロック共重合体もしくはグラフト共重合体を主成分とする表面を形成させた後、標的物質に対して親和性を有する物質を該共重合体の反応性官能基に固定化することを特徴とする刺激応答性分離材料の製造方法。

【請求項4】 刺激応答性領域よりなる分子鎖と反応性官能基を有する分子鎖とを有するブロック共重合体もしくはグラフト共重合体に、標的物質に対して親和性を有する物質を該共重合体の反応性官能基に結合させた後、基材表面上に保持させることを特徴とする刺激応答性分離材料の製造方法。

【請求項5】 刺激応答性領域よりなる分子鎖と反応性官能基を有する分子鎖とを有するブロック共重合体もしくはグラフト共重合体と、標的物質に対して親和性を有する物質を含む溶液を基材表面上に塗布した後、お互いを反応させることを特徴とする刺激応答性分離材料の製造方法。

【請求項6】 標的物質に対して親和性を有する領域と刺激応答性高分子鎖よりなる領域とを表面に有する刺激応答型分離材料を用いて、標的物質を該分離材料に結合させた後、刺激応答性高分子鎖の高次構造を変化させることにより、標的物質を該分離材料より脱離させることを特徴とする物質の分離精製方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

【産業上の利用分野】 本発明は、標的物質に対して特異的親和性を有する物質と刺激応答性高分子とを利用した新規な分離材料及び分離方法に関する。

**【0002】**

【従来の技術】 近年、細胞工学や遺伝子工学等の発展に伴い、細胞や遺伝子を利用した細胞治療や遺伝子治療の研究が盛んとなっており、目的とした細胞や生体物質を損傷させることなく分離する技術が重要となっている。また、バイオテクノロジーの発展により、生物工学的手法によるペプチド、蛋白質、糖蛋白質質といった生理活性分子の生産が行われるようになってきており、細胞やバイオプロダクツの簡便で損傷の少ない分離精製技術が望まれている。

【0003】 従来より化学工業分野で使用されている吸着・分配・蒸留・析出といった分離・精製の単位操作では、熱や有機溶媒の添加などにより、被精製物質に対し

て大幅な環境変化を強いるため、前述の細胞やバイオプロダクツの分離には適していないことが多い。

【0004】 細胞やバイオプロダクツの分離方法として、体積（分子量）や密度による方法（沈降速度法、密度勾配遠心法、ゲル濾過法など）、電場中での移動度の差による方法（電気泳動など）、等電点による方法（焦点電気泳動など）、2液相間への分配による方法（2層分配法、分配クロマトグラフィー）、固相への吸着性の差による方法（吸着クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー）などが知られている。

【0005】 これらの分離方法の多くは、物理化学的性状が大きく異なる細胞成分の分離には適用できるものの、物理化学的性状が良く似た成分や細胞、例えばリンパ球亜集団の分離などには適用が困難であった。この中で標的物質に対する選択性の高い方法は、アフィニティークロマトグラフィーであり、近年広く利用されるようになってきている。細胞を対象とするアフィニティークロマトグラフィーとしては、標的細胞の表層に存在する膜蛋白等に対するモノクローナル抗体を結合したビーズやシャーレを用いた分離方法が報告されており、本方法による各種リンパ球の亜集団分離も報告されている。

（例えば、ジャーナル・オブ・イミュノロジカル・メソッド、第54号、251ページ、1983年に記載されているブラウンらの研究報告） この抗体を用いた方法は、特異性が極めて高いことで利点であるが、欠点として、吸着した細胞の脱着が困難なこと、抗体が細胞表層の抗原に結合するための時間（接触時間）を長くすること、その結果、非特異的な吸着が増加すること、などがあった。

【0006】 前述の欠点を改良した方法としては、アビジン-ビオチンのような親和性の高い結合を利用して、短時間で分離材料に吸着させる方法がWO91/16116で提案されている。すなわち、ビオチンで標識した抗体を予め時間をかけて標的細胞に結合させた後、アビジンを結合した分離材料に吸着させることにより、短時間で効率良く標的細胞を分離できることとなる。しかしながら、この方法では、物理的振動を用いて抗体と標的細胞の結合やアビジンとビオチンとの結合を解離することにより標的細胞の回収が行われているため、ビーズ同士の衝突等による細胞の損傷や機能低下が免れない。

【0007】 細胞機能を損なわないように回収する方法としては、特開平2-211865に記載された水に対する上限または下限臨界溶解温度が0～80℃にあるポリマーもしくはコポリマーで表面を被覆した細胞培養基材が報告されている。この方法は、温度により疎水性-親水性と相転移する温度応答性高分子を利用したものであり、温度応答性高分子が疎水性で収縮した状態の時に細胞を吸着させた後、温度を変化させ、親水性となって膨潤するときに吸着した細胞を脱着させる方法である。

この方法の欠点は、細胞に対する特異性が低いため、種

**THIS PAGE BLANK (USP)**



々の細胞が存在する液体から特定の細胞を回収することができないことである。特に、マクロファージ、白血球、リンパ球などの多くは、曲率の小さい表面に吸着することが知られており、フィルターや不織布形状に加工したこの分離材料を用いて、特定のリンパ球などを選択的に回収することは不可能であった。

#### 【0008】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明は、標的物質に対する高い特異性を有し細胞を簡便に回収できる分離材料及び分離システムを提供することを目的とする。

#### 【0009】

【課題を解決するための手段】上記発明の目的は以下の刺激応答型分離材料及びその製造方法によって達成される。

(1) 標的物質に対して親和性を有する領域と刺激応答性高分子鎖よりなる領域とを表面に有する刺激応答型分離材料。

(2) 標的物質に対して親和性を有する分子鎖と刺激応答性領域よりなる分子鎖とを有するブロック共重合体もしくはグラフト共重合体を主成分として構成された表面を有する(1)の刺激応答型分離材料。

(3) 刺激応答性領域よりなる分子鎖と反応性官能基を有する分子鎖とを有するブロック共重合体もしくはグラフト共重合体を主成分とする表面を形成させた後、標的物質に対して親和性を有する物質を該共重合体の反応性官能基に固定化することを特徴とする刺激応答性分離材料の製造方法。

(4) 刺激応答性領域よりなる分子鎖と反応性官能基を有する分子鎖とを有するブロック共重合体もしくはグラフト共重合体に、標的物質に対して親和性を有する物質を該共重合体の反応性官能基に結合させた後、基材表面上に保持させることを特徴とする刺激応答性分離材料の製造方法。

(5) 刺激応答性領域よりなる分子鎖と反応性官能基を有する分子鎖とを有するブロック共重合体もしくはグラフト共重合体と、標的物質に対して親和性を有する物質とを含む溶液を基材表面上に塗布した後、お互いを反応させることを特徴とする刺激応答性分離材料の製造方法。

(6) 標的物質に対して親和性を有する領域と刺激応答性高分子鎖よりなる領域とを表面に有する刺激応答型分離材料を用いて、標的物質を該分離材料に結合させた後、刺激応答性高分子鎖の高次構造を変化させることにより、標的物質を該分離材料より脱離させることを特徴とする物質の分離精製方法。

【0010】本発明においては、標的物質は特に限定されず、蛋白質、糖蛋白質、核酸、細胞、人工細胞、合成高分子化合物などを例示できる。本発明の分離材料は、標的物質に対して親和性を有する領域と刺激応答性高分子鎖よりなる領域とを表面に有する材料であり、表面が相分離していることが特徴である。従って、標的物質に対して親和性を有する分子(リガンド)が、相分離構造に従ってミクロ的に不均一に存在することが特徴となるが、その際、標的物質の大きさが該標的物質に対して親和性を有する領域の大きさより小さいことが好ましい。相分離構造を形成させる方法としては、ブロックもしくはグラフト共重合体を用いる方法が好ましい。高分子間で相溶性を示すものもあるが、多くの高分子は相分離を起こすことが知られている。特に、ブロックもしくはグラフト共重合体は、海島状、縞状、ラメラ状に規則的なミクロ相分離構造を発現することが知られているおり、このような構造が本発明の分離材料としては好ましい。表面における標的物質の親和性領域の比率は、外部環境により異なるため明確に規定できないが、標的物質を吸着する時に、10～90%、好ましくは、20～80%である。

【0011】標的物質としては、サイズが大きい「細胞」を好適に例示できる。また、細胞を標的とした場合、該細胞に対して親和性を有する分子(リガンド)が、相分離構造に従ってミクロ的に不均一に存在しているため、細胞が分離材料表面に吸着されるときにしばしば観察されるキャッピング現象が回避されソフトに吸着することとなる。そのため、細胞の損傷が少なくなり、吸着した細胞の機能を発現させる場合や分離精製(回収)する場合に、優れた性能を発現することとなる。標的とする細胞は限定されず、例えば、上皮系細胞、肝実質細胞、膵ラ島細胞、マクロファージ、単核球、NK細胞(CD56<sup>+</sup>)、血液幹細胞などの未分化細胞(CD34<sup>+</sup>)、Bリンパ球、Tリンパ球、及びそのサブセット(CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD19<sup>+</sup>、CD71<sup>+</sup>、IL2R<sup>+</sup>など)、各種の腫瘍細胞や機能細胞等より、目的に応じて選定される。

【0012】刺激応答性高分子とは、熱、PH、電位、光などにより高次構造が変化して、水溶液中で膨潤したり収縮する高分子であればよい。例えば、水に対する上限臨界温度または下限臨界温度を有し、温度変化に応答して、膨潤-収縮する高分子を好適に例示できる。そのような高分子としては、N-イソプロピルアクリルアミドやN、N-ジエチルアクリルアミド、N-イソプロピルメタアクリルアミドなどのアクリルアミドやメタアクリルアミドの誘導体類をはじめ、ビニルメチルエーテルなどのビニルエーテル類などのポリマーやコポリマーを例示できる。また、光により構造変化させる場合は、例えば、アゾベンゼン基を有する吸水性高分子のように光異性化をおこす高分子、トリフェニルメタンロイコハイドロオキシドのビニル誘導体とアクリルアミド系単量体との共重合体のように光イオン解離する感応基を有する温度応答性高分子、スピロベンゾピランを含むN-イソプロピルアクリルアミドゲルのように疎水性相互作用

子鎖よりなる領域とを表面に有する材料であり、表面が相分離していることが特徴である。従って、標的物質に対して親和性を有する分子(リガンド)が、相分離構造に従ってミクロ的に不均一に存在することが特徴となるが、その際、標的物質の大きさが該標的物質に対して親和性を有する領域の大きさより小さいことが好ましい。相分離構造を形成させる方法としては、ブロックもしくはグラフト共重合体を用いる方法が好ましい。高分子間で相溶性を示すものもあるが、多くの高分子は相分離を起こすことが知られている。特に、ブロックもしくはグラフト共重合体は、海島状、縞状、ラメラ状に規則的なミクロ相分離構造を発現することが知られているおり、このような構造が本発明の分離材料としては好ましい。表面における標的物質の親和性領域の比率は、外部環境により異なるため明確に規定できないが、標的物質を吸着する時に、10～90%、好ましくは、20～80%である。

【0012】刺激応答性高分子とは、熱、PH、電位、光などにより高次構造が変化して、水溶液中で膨潤したり収縮する高分子であればよい。例えば、水に対する上限臨界温度または下限臨界温度を有し、温度変化に応答して、膨潤-収縮する高分子を好適に例示できる。そのような高分子としては、N-イソプロピルアクリルアミドやN、N-ジエチルアクリルアミド、N-イソプロピルメタアクリルアミドなどのアクリルアミドやメタアクリルアミドの誘導体類をはじめ、ビニルメチルエーテルなどのビニルエーテル類などのポリマーやコポリマーを例示できる。また、光により構造変化させる場合は、例えば、アゾベンゼン基を有する吸水性高分子のように光異性化をおこす高分子、トリフェニルメタンロイコハイドロオキシドのビニル誘導体とアクリルアミド系単量体との共重合体のように光イオン解離する感応基を有する温度応答性高分子、スピロベンゾピランを含むN-イソプロピルアクリルアミドゲルのように疎水性相互作用

**THIS PAGE BLANK (US**

が光変化する温度応答性高分子などを用いることができる。

【0013】電気化学的に構造変化を生じさせるには、ビニルフェロセンとイソプロピルアクリルアミド共重合体のようにフェロセニル基を側鎖に有する温度応答性高分子を例示することができる。フェロセニル基は、還元状態では疎水性の官能基であるが、酸化されると親水性が高まるため、一定の温度領域で電気化学的に膨潤～収縮を制御することができる。

【0014】電気や光により制御できる温度領域は、アルキルアクリルアミドのような温度応答性高分子を形成するモノマーに親水性モノマーや疎水性モノマーを少量共重合させることにより、任意に制御することが可能である。たとえば、疎水性モノマーを共重合させると相転移温度は低くなり、親水性モノマーを共重合させると相転移温度は高くなる。

【0015】イオンにより構造変化を誘導したり加速するためには、イオン解離する官能基を有するモノマーを共重合したり、イオンを捕捉する分子を側鎖に導入させてやればよい。例えば、ナトリウムやカリウムを認識するクラウンエーテル（ベンゾ[18]クラウン-6）を側鎖にポリプロピルアクリルアミドは、ナトリウムイオンやカリウムイオンにより相転移が引き起こされる。

【0016】標的物質に対して親和性を有する領域には、抗原-抗体、酵素-基質（阻害剤）、各種の生理活性物質とそのレセプターとの反応などの生体の制御機構で見られる特異的親和性により標的物質を吸着するリガンドや、静電相互作用、疎水性相互作用、水素結合、ファンデルワールス相互作用等によって標的物質に対して親和性を示す合成化合物やそれらの相互作用を効果的に発現できるよう人工的に設計された分子認識素子などが存在する。

【0017】標的物質に対して親和性を有する領域は、刺激応答性高分子鎖と必ずしも化学的に結合していなくてもよく、ブレンド法や積層法を利用して相分離構造を形成させてもよい。また、金属、セラミック、あるいは有機物よりなる直径5  $\mu$  以下、好ましくは2  $\mu$  以下の微粉体などを利用して不均一構造を形成させ、該微粉体上に標的細胞に対して親和性を有する物質を結合させることも可能である。

【0018】リガンドの反応性官能基への固定化は、公知の化学反応を用いた方法で達成できるが、両者の結合の間に、スペーサーや2種以上の化合物よりなる結合が存在していてもよい。結合様式としては、生理的条件下で容易に脱離しないことが望ましいが、必ずしも共有結合である必要はなく、イオンコンプレックスや電荷移動錯体などを利用した結合でもかまわない。また、生理的条件下で高い親和性を有するビオチン-アビジン、ビオチン-ストレプトアビジン、リボフラビン-リボフラビン結合蛋白、プロテインA-IgG、プロテインG-IgG

などの生化学的親和性を利用した結合であってもよい。ビオチン-アビジンの組み合わせは、ビオチン標識抗体などが市販されており容易に入手できるため、標的物質に対する抗体をアビジンを介して反応性官能基に固定化することができる。

【0019】反応性官能基とは、標的物質に対して親和性を有するリガンドを結合できる官能基であれば良く、カルボキシル基、アルデヒド基、アミノ基、イミノ基、スルホン酸基、エポキシ基、イソシアネート基、酸クロリド基、ヒドロキシ基、チオール基、ジスルフィド基などの官能基を例示できる。また、カルボニルジイミダゾール、トシル、トレシルなどで活性化されていてもかまわない。これらの官能基を利用して、直接あるいは縮合剤や架橋剤を用いて、標的物質に対するリガンドを結合することが可能である。反応性官能基がエポキシ基のように、直接アミノ基やカルボキシル基と反応するタイプであると反応操作が簡略化できるため好ましい。ヒドロキシ基のように反応性の低い官能基の場合、両末端に反応性の高い官能基を有する架橋剤、例えばポリイソシアネート類、ポリエポキシ化合物、ジアルデヒド化合物などを利用してリガンドを固定化することも可能である。

【0020】反応性官能基を有する分子鎖を形成させる方法は、公知の方法でかまわない。例えば、官能基を有する単量体を重合したり、他の単量体と共重合することにより反応性官能基を有する分子鎖を形成させる方法や、すでに形成された分子鎖を化学修飾することにより反応性の高い官能基を導入する方法などを例示できる。分離材料の形態は、特に限定されず、プレート状、シャーレ状、繊維状、不織布状、多孔質膜、多孔質フィルター、ビーズなどを例示でき、それぞれの形態にあったカラムなりモジュールに収納されて使用されてもかまわない。また、その基材となる材質についても水に対して非溶解性であれば特に限定されず、ポリオレフィン、ハロゲン化ポリオレフィン、ポリウレタン、ポリアミド、ポリエステル、綿、ポリスチレン、及びそれらの変性物や共重合体など、既存の材料を例示することができる。

【0021】分離材料に吸着した標的物質の回収は、温度、光、電気等の刺激により刺激応答性高分子の高次構造を急速に変化せしめることにより行う。例えば、刺激応答性領域が収縮した条件下でリガンドが表面に存在する分離材料の場合、この状態で標的物質を吸着させた後、外部刺激により刺激応答性領域を膨潤させることにより、その急激な環境変化を利用して標的物質が材料表面より脱着することとなる。脱着させた場合の回収率は、固定化したリガンドの種類や状態、刺激応答領域と吸着領域の構造や組成比により異なり、使用条件に応じた条件設定が必要となるが、50%以上、好ましくは80%以上である。

【0022】標的物質と刺激応答性高分子の間に弱い結合が存在する場合、その結合を解離することによって標

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

的物質を脱離させてもかまわない。回収率の向上などを目的として、必要に応じて物理的な方法や化学的な方法を併用してもかまわない。

#### 【0023】

##### 【実施例】

（実施例1）標的物質としてCD4<sup>+</sup>細胞を設定し、標的物質に対して特異的親和性を有する物質としてCD4に対する抗体、刺激応答性高分子としてポリ（N-ジェチルアクリルアミド）を用いて分離用吸着材料を作製し、CD4<sup>+</sup>細胞の分離を検討した。

【0024】主鎖にアゾ基を有するポリグリシジルメタクリレートとを重合開始剤として、N、N-ジェチルアクリルアミドをジメチルスルホキシド中で80℃、16時間重合し、石油エーテル中で再沈殿させた後、ポリマーを減圧乾燥させることにより、刺激応答性ドメインとしてポリ（N、N-ジェチルアクリルアミド）、反応性ドメインとしてポリ（グリシジルメタクリレート）を有するブロックコポリマー（モル組成比3：1）を得た。

【0025】このブロック共重合体の3%ジオキサン溶液を、厚さ100μmのポリウレタンシートにコーティングした。続いて、0.01wt%のポリエチレンイミン（平均分子量1200）を含むCD4抗体の5mg/ml溶液をコーティングした後、38℃で16時間反応させることにより、刺激応答型分離材料を得た。

【0026】この材料に、人新鮮血バフィーコートより1%アルブミン添加PBSで洗浄して調整した白血球液（ $1 \times 10^6 / \text{ml}$ ）を37℃で接触させることにより、CD4<sup>+</sup>細胞を吸着させた。位相差顕微鏡を用いて、吸着細胞の脱着を観察したところ、1%アルブミンを添加したPBSで25℃でリンスすることにより脱着できることを確認した。

【0027】（実施例2）1.0%のポリメタクリル酸を溶解させたDMSO溶液と、実施例1で作製したブロックコポリマーの4%DMSO溶液を1：1で混合した後、ポリメタクリル酸を表面グラフト重合したポリエチレンシートにコーティングした後、60℃40時間反応させた。続いて、5mg/mlの1-エチル-3-（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（シグマ社製）溶液を20ml（pH5.5）シャーレに注入し、5分間室温で浸漬させた。続いて、CD4抗体の5mg/ml溶液と接触させて室温で1時間時々攪拌しながら反応させた後、グリシンを最終濃度で0.2モルとなるように添加して1時間放置した後、リン酸バッファー（PBS）でリンスすることによりCD4<sup>+</sup>細胞分離材料を作

\* 製した。

【0028】この材料に、人新鮮血バフィーコートより1%アルブミン添加PBSで洗浄して調整した白血球液（ $1 \times 10^6 / \text{ml}$ ）を37℃で接触させることにより、CD4<sup>+</sup>細胞を吸着させた。位相差顕微鏡を用いて、吸着細胞の脱着を観察したところ、1%アルブミンを添加したPBSで25℃でリンスすることにより脱着できることを確認した。

【0029】（実施例3）主鎖にパーオキサイド基を有するポリグリシジルメタクリレートとメチルアクリレートとの共重合体（1：1）を重合開始剤として、N-イソプロピルアクリルアミドをジメチルスルホキシド中で80℃、16時間重合して、刺激応答性ドメインとしてポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）、反応性ドメインとしてポリ（グリシジルメタクリレート-メチルアクリレート共重合体）を有するブロックコポリマー（モル組成比4.8：1）を得た。

【0030】0.5wt%のCD4抗体を含む20%DMSO溶液に上記ポリマー2wt%を含む60%DMSO溶液を1：1で混合した後、ポリメタクリル酸を表面グラフト重合したポリエチレンシートにコーティングし、60℃40時間反応させた。この材料に、人新鮮血バフィーコートより1%アルブミン添加PBSで洗浄して調整した白血球液（ $1 \times 10^6 / \text{ml}$ ）を37℃で接触させることにより、CD4<sup>+</sup>細胞を吸着させた。位相差顕微鏡を用いて、吸着細胞の脱着を観察したところ、1%アルブミンを添加したPBSで25℃でリンスすることにより脱着できることを確認した。

#### 【0031】

【発明の効果】本発明の分離材料や分離方法は、刺激応答領域と標的物質に対する親和性領域とが存在する。従って、刺激応答領域における体積変化が大きくなり吸着物質の脱着が起りやすくなる。また、相分離構造を形成させることにより、標的細胞が吸着した場合のキャピング現象を抑制することができるため、機能損傷の少ない高品質の細胞を回収できることとなる。その結果、従来困難であった血球系細胞や機能細胞の分離精製が簡便にできるようになり、本発明の分離材料や技術は、標的細胞の分離、増殖、機能変換等を利用したバイオプロダクツの生産や細胞治療、遺伝子治療、診断等に効果を発揮することとなる。また、本発明は、医療分野のみならず各種の産業分野において新しい分離技術として効果を発現することとなる。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06262071 A**

(43) Date of publication of application: **20.09.94**

(51) Int. Cl

**B01J 20/26**  
**B01D 15/08**  
**C08F 2/00**  
**C08F 2/44**  
**C08F 20/56**  
**C08J 9/40**  
**C08L101/00**  
**G01N 30/48**

(21) Application number: **05052280**

(22) Date of filing: **12.03.93**

(71) Applicant: **MITSUBISHI KASEI CORP**

(72) Inventor: **HOSOYA KEN**

**(54) NEW RESIN FOR SEPARATION AND ITS PREPARATION**

**(57) Abstract:**

**PURPOSE:** To provide a resin for separation which shows a significant change in its separation properties according to temperature and enables separation even when such separation is difficult only with a separation agent, by changing temperature.

**CONSTITUTION:** The subject preparation method of new resin for separation comprises preparing resin for separation and resin which consists of poly-N-isopropylacrylamide supported on a porous polymerization particle by impregnating an organic polymerization particle with a vinyl monomer containing 25wt.% to 100wt.% of crosslinkable polyvinyl monomer, a

radical polymerization initiator and pore-generating solvent, then suspending the particle in a water medium and adding N-isopropylacrylamide and a water-soluble polymerization initiator to the suspension during ongoing polymerization reaction.

**COPYRIGHT:** (C)1994,JPO&Japio

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-262071

(43)公開日 平成6年(1994)9月20日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
B 0 1 J 20/26		Z 7202-4 G		
B 0 1 D 15/08				
C 0 8 F 2/00	M A J	7442-4 J		
2/44	M C S	7442-4 J		
20/56	M N C	7242-4 J		
審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 6 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平5-52280

(22)出願日 平成5年(1993)3月12日

(71)出願人 000005968

三菱化成株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 細矢 憲

京都府京都市伏見区奉行前町官有地桃山合  
同宿舍142号

(74)代理人 弁理士 長谷川 暁司

(54)【発明の名称】 新規な分離用樹脂及びその製造方法

(57)【要約】

【構成】 ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドが多孔性重合体粒子に担持されてなる分離用樹脂及び該樹脂を有機重合体粒子に、架橋性ポリビニル単量体を25重量%から100重量%含むビニル単量体、ラジカル重合開始剤および多孔質化溶媒を含浸した後、該粒子を水性媒体に懸濁し、該懸濁液の昇温後、かつ重合反応継続中にN-イソプロピルアクリルアミドと水溶性重合開始剤を該懸濁液に添加することにより製造する方法。

【効果】 本発明は、従来の分離剤では不可能であった、温度によりその分離特性を大きく変化できる分離用樹脂を提供するものであり、単一の分離剤では困難な分離に対し、温度を変化させることによりその分離を可能にできる分離用樹脂を提供するものである。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ポリーN-イソプロピルアクリルアミドが多孔性重合体粒子に担持されてなる分離用樹脂。

【請求項2】 有機重合体粒子に、架橋性ポリビニル単量体を25重量%から100重量%含むビニル単量体、ラジカル重合開始剤および多孔質化溶媒を含浸した後、該粒子を水性媒体に懸濁し、該懸濁液の昇温後、かつ重合反応継続中にN-イソプロピルアクリルアミドと水溶性重合開始剤を該懸濁液に添加することを特徴とする請求項1に記載の分離用樹脂の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、液体クロマトグラフィ用充填剤、各種分離用樹脂、吸着剤等として有用であり、特に温度によりその分離特性が大きく変化する分離用樹脂及びその製造方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】温度変化によりその分離特性が大きく変化する分離用樹脂は、従来知られていない。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、温度によりその分離特性が変化するという新規な特性を有する分離用樹脂及びそれを簡便な方法により該樹脂を製造する方法を提供することを目的とする。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】即ち、本発明は、ポリーN-イソプロピルアクリルアミドが多孔性重合体粒子に担持されてなる分離用樹脂をその要旨とする。また、有機重合体粒子に、架橋性ポリビニル単量体を25重量%から100重量%含むビニル単量体、ラジカル重合開始剤および多孔質化溶媒を含浸した後、該粒子を水性媒体に懸濁し、該懸濁液の昇温後、かつ重合反応継続中にN-イソプロピルアクリルアミドと水溶性重合開始剤を該懸濁液に添加することを特徴とする該分離用樹脂の製造方法をその要旨とする。

【0005】以下、本発明を詳細に説明する。本発明の樹脂は、種粒子に架橋性ビニル単量体を含有するビニル単量体を含浸した後重合する所謂シード重合法により製造される。すなわち、本発明で用いられる種粒子としての有機重合体粒子は乳化重合、ソープフリー乳化重合、分散重合、懸濁重合等の一般に良く知られた造球重合により製造できる。中でも、乳化重合、ソープフリー乳化重合、分散重合等で得られる重合体粒子は懸濁重合により製造されたものに比較しその粒子径分布が狭く好ましい。

【0006】種粒子の組成としては、芳香族モノビニル単量体および/または脂肪族モノビニル単量体からなる重合体が好適である。これらは単独重合体もしくは2種以上の単量体の共重合体の何れでも良く、1重量%以下の架橋性ポリビニル単量体との共重合体であっても良

い。代表的には、ポリスチレンもしくはポリメタクリル酸エステルからなる粒子が好ましい。種粒子の大きさは0.1~1000 $\mu$ mの範囲で、目的に応じ任意に選ぶことができる。

【0007】そしてこのような有機重合体粒子からなる種粒子に含浸させる架橋性ポリビニル単量体としては、芳香族ポリビニル単量体、脂肪族ポリビニル単量体が好適であり、芳香族ポリビニル単量体としては、ジビニルベンゼンが、また、脂肪族ポリビニル単量体としては多価アルコールのポリ(メタ)アクリレートやアルキレンポリ(メタ)アクリルアミドが好ましい。その一例として、エチレングリコールジ(メタ)アクリレート、ポリエチレングリコールジ(メタ)アクリレート、グリセロールジ(メタ)アクリレート、トリメチロールプロパントリ(メタ)アクリレート、テトラヒドロキシブタンジ(メタ)アクリレート、メチレンビスアクリルアミド等が挙げられる。モノビニル単量体およびポリビニル単量体の混合物を含浸させる。

【0008】架橋性ポリビニル単量体以外のビニル単量体としては、モノビニル単量体であり、該モノビニル単量体としては、芳香族モノビニル単量体、脂肪族モノビニル単量体を使用される。芳香族モノビニル単量体としては、スチレン、*t*-ブトキシカルボニルスチレン、エチルスチレン、ハロアルキルスチレン等のスチレン誘導体、安息香酸ビニル、*p*-*t*-ブチル安息香酸ビニル等のカルボン酸ビニル等が好ましい。また、脂肪族モノビニル単量体としては、モノ不飽和カルボン酸、モノ不飽和カルボン酸エステル、アクリルアミド誘導体等が好ましく、その一例としてメチル(メタ)アクリレート、ベンジル(メタ)アクリレート等のアルキル(メタ)アクリレート、グリシジル(メタ)アクリレート、グリセロールモノ(メタ)アクリレート、2-ヒドロキシエチル(メタ)アクリレート、シクロヘキサンカルボン酸ビニル、ブタン酸ビニル、N-イソプロピルアクリルアミド等が挙げられる。

【0009】また、これらビニル単量体の量は使用する種粒子の大きさと目的とする粒子の大きさを考慮して適宜選択される。重合体粒子に含浸させるビニル単量体中の架橋性ポリビニル単量体の量は25重量%から100重量%であり、好ましくは40重量%から100重量%である。

【0010】種粒子に含浸させる多孔質化溶媒としては、シード重合時に相分離剤として作用し、生成する粒子の多孔質化を促進する有機溶媒である脂肪族あるいは芳香族炭化水素類、エステル類、ケトン類、アルコール類、エーテル類が挙げられる。このような有機溶媒としては、例えばトルエン、キシレン、シクロヘキサン、オクタン、酢酸ブチル、フタル酸ジメチル、フタル酸ジブチル、メチルエチルケトン、メチルイソブチルケトン、ジブチルエーテル、1-ヘキサノール、2-オクタノー

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

ル、デカノール、シクロヘキサノール等が挙げられ、これらは単独もしくは混合して使用する。特に、多孔質化により形成される細孔表面に、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを効率よく担持させる為に、後で添加する単量体であるN-イソプロピルアクリルアミドの溶解度よりもその重合体であるポリ-N-イソプロピルアクリルアミドの溶解度が高い多孔質化溶媒が好ましく、一例としてシクロヘキサノールを挙げることができる。

【0011】シード重合時のラジカル重合開始剤は過酸化ベンゾイル、ブチルパーオキシヘキサノエート等の過酸化系開始剤、アゾビスイソブチロニトリル、アゾビスイソバレロニトリル等のアゾ系開始剤が好ましい。これら重合開始剤は、シード重合開始の為に重合温度に昇温される前に種粒子に含浸する。重合開始剤の含浸はビニル単量体或いは多孔質化溶媒に溶解し、ビニル単量体の含浸と同時に、またはその前後で行う。

【0012】また、ビニル単量体、多孔質化溶媒、ラジカル重合開始剤を種粒子に含浸させる際に、場合により種粒子に対して親和性が高い溶媒で希釈し含浸させることも好ましく、必要に応じて、重合開始剤をこの溶媒に溶解し、添加することもできる。このような溶媒としては、アルコール、アセトン、テトラヒドロフラン、ジオキサン等の水混和性低沸点溶媒やジクロロエタン、塩化メチレン等のハロゲン化炭化水素等が挙げられる。これらは含浸を促進する溶媒として機能するが、含浸後は重合温度に昇温してシード重合を開始する前に減圧留去することが好ましい。

【0013】本発明では、このようにビニル単量体、多孔質化溶媒、ラジカル重合開始剤等を用いて種粒子を肥大化させた後、水性媒体中で懸濁重合を行う。水性媒体には、ビニル単量体、多孔質化溶媒、重合開始剤等が含浸され肥大化した種粒子が、シード重合中に凝集、変形、融着することを防止し、その分散安定性を増す為に、分散安定剤を含有する。該分散安定剤としては公知のアニオン系、ノニオン系の界面活性剤、およびポリビニルピロリドン、ポリエチレンイミン、ビニルアルコール-酢酸ビニルコポリマー等の合成高分子が好適であり、特にビニルアルコール-酢酸ビニルコポリマーが好ましい。中でも、その重合度が500前後である比較的低分子量のビニルアルコール-酢酸ビニルコポリマーが特に好ましい。

【0014】本発明において、重合温度に昇温後、重合反応継続中に添加されるN-イソプロピルアクリルアミドの添加量は、シード重合に先立ち予め含浸させるビニル単量体に対し1~30重量%であり、好ましくは2~20重量%である。N-イソプロピルアクリルアミドの添加時期は、所定の重合温度に昇温し、シード重合を開始した後、0.5~12時間の間、好ましくは1~6時間の間に、一括もしくは分割して添加する。分割して添加する場合は、例えば10~60分毎に添加する方法が

好ましい。N-イソプロピルアクリルアミドは、そのまま添加するか、もしくは水溶性有機溶媒で希釈して添加する。また、N-イソプロピルアクリルアミドの添加と同時に水溶性重合開始剤、例えば過硫酸カリウムを水性媒体に添加する。シード重合の重合温度は使用する重合開始剤の種類にもよるが、50℃~80℃が好ましい。シード重合の重合時間は、重合開始剤の半減期前後またはそれ以上が好ましく、例えば、3時間~48時間が好ましい。

10 【0015】シード重合における水性媒体としては、水および分散安定剤の他、必要に応じ、上記N-イソプロピルアクリルアミドと共に加えられる水溶性重合開始剤、それらを溶解する水溶性有機溶媒、また、水溶性重合開始剤を使用しない場合は、水中重合禁止剤が含まれる。本発明においては、一般的なシード重合方法が適用できるが、乳化重合法またはソープフリー乳化重合法で製造された0.1~1.5μmの重合体粒子を種粒子とする場合には、まず膨潤助剤による一次膨潤を行った後、シード重合することにより100μm程度までの粒子径が均一な多孔質粒子が製造できる方法(J. Ugelstadら、Makromolekulare Chemie、第80巻、737頁、1979年)が好適に用いられる。

20 【0016】また、分散重合により製造された1~10μmの重合体粒子を種粒子とし、シード重合する方法(例えば特開昭64-26617号公報)も適用できる。本発明においては、重合完結後、種粒子として用いた有機重合体粒子の良溶媒を用いて洗浄することにより、種粒子由来の重合体の一部または全部を除去することによっても、所望の多孔度の樹脂が得られる。

30 【0017】本発明方法で得られる多孔性重合体粒子の好ましい細孔物性としては、BET法で測定した乾燥状態での平均細孔半径として、10~6000オングストローム、好ましくは20~2000オングストロームであり、細孔容積として0.2~1.8ml/g、好ましくは0.4~1.2ml/gであり、細孔表面積として1~2000m<sup>2</sup>/g、好ましくは5~1500m<sup>2</sup>/gである。

40 【0018】本発明方法により、粒子細孔表面にポリ-N-イソプロピルアクリルアミドが導入されたことは、簡便には重量の増加や明らかな物性の変化により検証できるが、更に分析的には元素分析や赤外吸収スペクトルの測定により確認できる。本発明の分離用樹脂は、その樹脂表面のポリ-N-イソプロピルアクリルアミドが分離する物質との相互作用点として働くが、この作用点が温度変化によって変化すると考えられ、そのため、従来の樹脂の場合は温度が変化しても分離対象の物質Aの保持容量比(k')と物質Bの保持容量比(k'')の比(k'/k'')は殆ど変化しないが、本発明の樹脂の場合、この比(k'/k'')の変化が大きい。従って、

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

温度変化により、例えば、低温時には分離が不可能であった物質の分離が高温時で可能となる等の温度による吸着特性が変化するなど本発明の樹脂には温度応答性を有する分離用樹脂であると言える。

#### 【0019】

【実施例】以下、本発明を実施例により説明するが、本発明はこれら実施例より何ら限定されるものではない。

#### 【0020】実施例1

##### (1) ポリスチレン種粒子の調製

水（超純水を更にアルゴンをバブリングしながら沸騰させた後、冷却したもの）300mlに塩化ナトリウム0.27gを溶解させ、これに蒸留精製したスチレン5mlを加えた。これらを室温においてメカニカルスターラーで緩やかに攪拌しながらさらに20分間アルゴンをバブリングし反応容器の中を置換した後、容器を密閉した。容器の温度を75℃にあげ、同時に攪拌速度を350rpmにあげた。この状態を30分間保った後、水27.8mlに溶解させた過硫酸カリウム0.21gを加え重合を開始した。最初透明であった溶液は約20分で乳濁しはじめた。重合開始から30分後さらに5mlのスチレンを加えた後、1時間毎に5mlのスチレンを、最終的に加えたスチレンが全量が40mlになるまで加えた。重合時間は開始剤添加後22.5時間であった。重合後の乳化液はだまかに固形物を取り除いた後、遠心分離（4500rpmで30分間）後上澄み液を捨て、水を加えて再度粒子を分散させた後同様に遠心分離し上澄み液を除去した。この操作を上澄み液が完全に透明になるまで繰り返した。再度、水に分散させた後、光学顕微鏡で粒子を観察したところ粒子径はほぼ1μmの極めて単分散性の高い（粒子径分布の狭い）ポリスチレンビーズが得られていることが確認できた。ポリスチレン粒子の重量を基とした収率は65%であり、最終的に調製したポリスチレン粒子の水分散液の濃度は9.5重量%であった。この粒子径単分散ポリスチレン粒子分散液を以後のシード重合に種粒子として使用した。

##### 【0021】(2) 膨潤助剤による一次膨潤

フタル酸ジブチル0.95mlに過酸化ベンゾイル0.085gを溶解させ、これにドデシル硫酸ナトリウム0.04gおよび水10mlを加え、超音波発生器を用いて氷冷下に微分散液を調製した。このようにして調製した膨潤助剤の微分散液に上記(1)で調製したポリスチレン種粒子の水分散液（9.5重量%）を1.4ml加えて、室温で緩やかに攪拌（マグネチックスターラー、125rpm）しながら膨潤助剤を種粒子に含浸させた。この段階の膨潤完結は光学顕微鏡で確認したが、2時間から4時間の間に完全に終了した。

##### 【0022】(3) 温度応答性ポリマー粒子の調製

シクロヘキサノール10mlおよびエチレングリコールジメタクリレート9ml（9.54g）をポリビニルアルコール（重合度500、けん化度89%）1.92g

を水90mlに溶解させたものに加えた。氷冷下に超音波発生器を用いて微分散液を調製し、これを上記(2)において調製した一次膨潤粒子に加え、同様に室温で緩やかに攪拌しながら（125rpm）微分散液を膨潤粒子に含浸させた（1時間で終了、この操作を二次膨潤と呼ぶ）。二次膨潤が終了した懸濁液を200mlのセパラブルフラスコに移し、緩やかに攪拌しながら室温でアルゴンを20分間バブリングした。容器を密閉したのち、温度を80℃に上げてシード重合を開始した。重合開始後1時間経過した時点で、N-イソプロピルアクリルアミド（以下、「NIPAM」と称す）1gおよび過硫酸カリウム0.01gを固体のまま重合容器に添加した。攪拌しながら更に20時間重合を行った。この過程でのN-イソプロピルアクリルアミドからなる二次粒子の生成は認められなかった。重合終了後、懸濁液は水200mlに注ぎ入れ、超音波発生器で粒子が均一に分散するまで振とうした後、室温で一夜静置した。上澄み液を捨てた後、メタノール200mlを加え同様に超音波発生器で粒子を再度分散させた後、静置し粒子が完全に沈降した後、上澄み液を捨てた。この操作をメタノールで更に二回、テトラヒドロフランで二回繰り返した後ミクロフィルター（住友電工製Fluoropore、FP-200）で粒子をろ過し、室温で乾燥させた後、重量を求めた。得られた粒子の重量は10.2gであり、用いたモノマーを基に算出した収率は98%であった。元素分析による各元素の含率は炭素：59.04%、水素：7.27%、窒素：0.86%であり二次粒子の生成が認められないことから、ほぼ定量的にNIPAMは粒子内に取り込まれたと考えられる。粒子の多孔度物性はBET法による測定により、細孔表面積450m<sup>2</sup>/g、細孔容積0.47ml/gであった。

【0023】得られた粒子を内径4.6mm、長さ150mmの液体クロマトグラフィー用カラムに充填し、60%アセトニトリル水溶液を溶離液として、流速0.8ml/分でベンゼンおよびアミルベンゼンの保持容量比（k'）を測定した。結果を第1表に示した。ベンゼンの保持容量比は30℃と50℃で殆ど変化しなかったが、アミルベンゼンは高温で保持容量比が低下しており、温度によって選択性が変化することがわかった。

【0024】一方更に、0.1Mの硫酸ナトリウムを含む0.02Mリン酸緩衝液/アセトニトリル混合液（容量比=8:2、pH7）を溶離液とし、低分子薬物であるバルビタール（C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、分子量184）、トルブタミド（C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>3</sub>S、分子量256）、フロセミド（C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>SCl、分子量331）の分離を行った。検出は紫外線吸光度測定器（波長250nm）により行った。この結果のクロマトグラムを図1（30℃）と図2（50℃）に示す。この結果より、30℃では分離が困難なトルブタミドとフロセミドの分離が50℃で行えることが分かった。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



【0025】

【表1】

第1表

カラム充填剤	ベンゼンの $k'$		アミルベンゼンの $k'$	
	30℃	50℃	30℃	50℃
実施例1	1.28	1.29	3.44	3.01
比較例1	1.64	1.28	4.45	3.41

$$k' = (T1 - T0) / T0$$

T1: カラムに注入したサンプル (ここでは、ベンゼンもしくはアミルベンゼン) の注入から溶出まで要した時間 (保持時間という)

T0: 充填剤が相互作用しない物質をカラムに注入した際の注入から溶出まで要する時間で、この場合ウラシルを用いて測定した。

## 【0026】比較例1

NIPAMを添加しない以外は、実施例1と全く同様にしてシード重合を行い、多孔質粒子を得た。得られた粒子を内径4.6mm、長さ150mmの液体クロマトグラフィー用カラムに充填し、60%アセトニトリル水溶液を溶離液として、流速0.8ml/分でベンゼンおよびアミルベンゼンの保持容量比 ( $k'$ ) を測定した。結果を第1表に示した。ベンゼンおよびアミルベンゼンの何れも高温で保持容量比が小さくなる傾向となり、温度により選択性の変化はなかった。

【0027】

\* 【発明の効果】本発明は、従来の分離剤では不可能であった、温度によりその分離特性を大きく変化できる分離用樹脂を提供するものであり、単一の分離剤では困難な分離に対し、温度を変化させることによりその分離を可能にできる分離用樹脂を提供するものである。

## 【図面の簡単な説明】

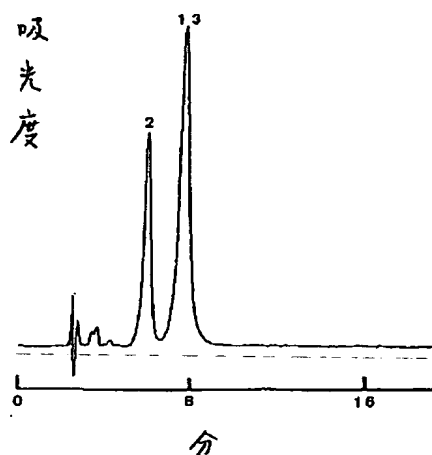
20 【図1】本発明の実施例1の分離用樹脂を用いて、低分子薬物 (バルビタール、トルブタミド、フロセミド) の分離を30℃で行った際のクロマトグラムを示す図であり、それぞれ、縦軸は吸光度、横軸は時間 (分) を表す。

【図2】本発明の実施例1の分離用樹脂を用いて、低分子薬物 (バルビタール、トルブタミド、フロセミド) の分離を50℃で行った際のクロマトグラムを示す図であり、それぞれ、縦軸は吸光度、横軸は時間 (分) を表す。

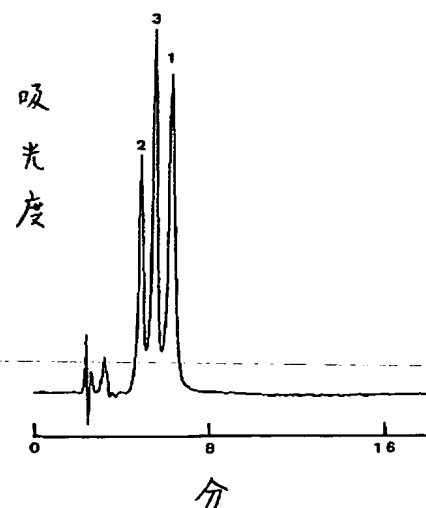
30 【符号の説明】

\* 1: バルビタール、2: トルブタミド、3: フロセミド

【図1】



【図2】



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C O 8 J 9/40		7310-4 F		
C O 8 L 101/00	L S Y	7242-4 J		
G O 1 N 30/48		P 8310-2 J		

1111

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07005161 A**(43) Date of publication of application: **10.01.95**

(51) Int. Cl.

**G01N 30/48  
C08L 83/10**(21) Application number: **04326039**(22) Date of filing: **10.11.92**(71) Applicant: **HIRAYAMA CHUICHI IHARA  
HIROTAKE**(72) Inventor: **HIRAYAMA CHUICHI  
IHARA HIROTAKE  
MUKAI TATSUYA****(54) FILLER FOR HIGH PERFORMANCE LIQUID  
CHROMATOGRAPHY****(57) Abstract:**

**PURPOSE:** To obtain a filler for reversed phase distribution chromatography for identifying the molecular profile without using the nonpolar aromaticity by a constitution wherein a copolymer, which can be represented by a chemical structural formula, is bonded to a silica gel through terminal X.

**CONSTITUTION:** The filter for reverse phase distribution chromatography has no aromaticity and accomplishes separation by carrying the nonpolarity of high molecular orientation on a silica gel. Consequently, a reversed phase chromatography for identifying the molecular profile through the use of molecular orientation of nonpolar phase is obtained. Since the nonpolar phase being carried has no aromaticity, undesired  $\pi$ - $\pi$  interaction with salute molecule does not take place. Furthermore,

since the nonpolar phase to be carried is a copolymer having a functional group X at one end thereof coupled with the silica gel, flexibility is provided and the extent of molecular orientation varies with the temperature. The holding time of solute can be controlled according to the variation of molecular orientation and the temperature is regulated to shorten the time required for analysis.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-5161

(43) 公開日 平成7年(1995)1月10日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

G 0 1 N 30/48

C 0 8 L 83/10

識別記号

L 8310-2 J

L R R

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数4 F D (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平4-326039

(22) 出願日 平成4年(1992)11月10日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成4年5月11日、  
 社団法人高分子学会発行の「第41回高分子学会年次大会」に発表

(71) 出願人 391012914

平山 忠一

熊本県熊本市下南部3-11-63

(71) 出願人 000117858

伊原 博隆

熊本県熊本市高平3丁目21-9

(72) 発明者 平山 忠一

熊本県熊本市下南部3-11-63

(72) 発明者 伊原 博隆

熊本県熊本市高平3-21-9

(72) 発明者 向井 達也

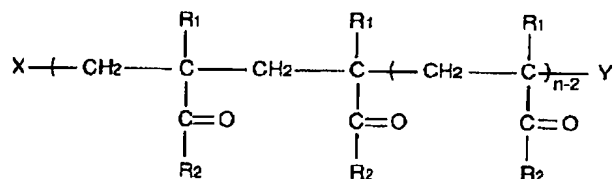
熊本県熊本市黒髪5-35-11

(54) 【発明の名称】 高性能液体クロマトグラフィー用充填剤

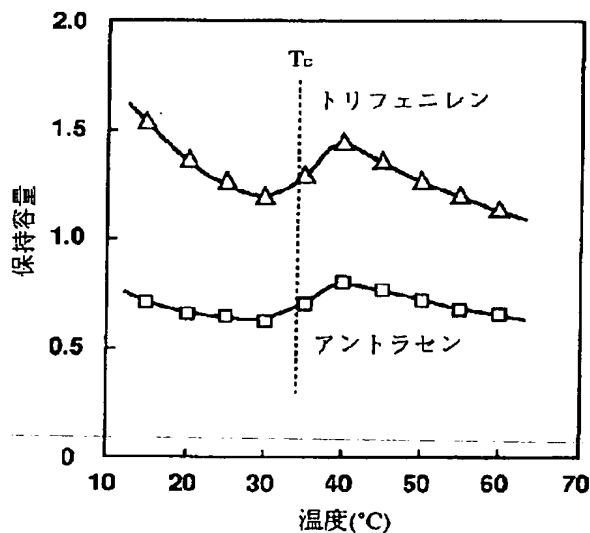
(57) 【要約】

【構成】 一般式化1 (式中のR<sub>1</sub>は水素原子又はメチル基を示す。R<sub>2</sub>は少なくとも(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>を含み、mが3~21、nが2~200を示す。) で表される重合物の末端のXを介してシリカゲルに結合した逆相分配クロマトグラフィー用充填剤。

【化1】



【効果】 本発明の充填剤は、分子配向性を利用した分子の形状を識別する逆相分配クロマトグラフィーを提供する。更に、当該充填剤は溶質分子との好ましくないπ-π相互作用を示さず、更に、分子配向度の変化を利用して、溶質の保持時間を制御することができる。

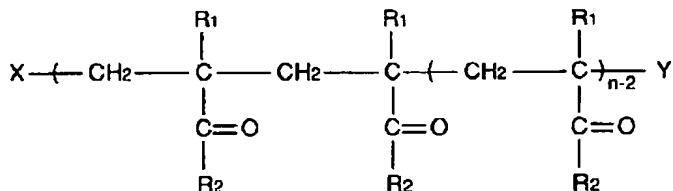


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 一般式 (化 1) からなる重合体が、末端 \*



【請求項 2】 化 1 中の  $n$  が 2 ~ 200 からなる請求項 1 記載の粒子。

【請求項 3】 化 1 中の  $\text{R}_2$  が少なくとも、化学構造において  $(\text{CH}_2)_m \cdot \text{CH}_3$  基を含み、 $m$  が 3 ~ 21 である請求項 1 記載の粒子。

【請求項 4】 化 1 中の  $\text{R}_1$  が水素原子あるいはメチル基である請求項 1 記載の粒子。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規な逆相分配クロマトグラフィー用充填剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 液体クロマトグラフィーは、一般に有機化合物、医薬、食品などの分析、分離などにおいて広範囲に渡り利用されている。特に、逆相分配クロマトグラフィーは、対象とする化合物の範囲が広く、分離の機構が単純なために、優れた方法として注目されている。従来の逆相分配クロマトグラフィー用の充填剤としては、例えばシリカゲル表面をオクチル基又はオクタデシル基などにより非極性化された充填剤が知られている。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、前記シリカゲル粒子のような充填剤では、分離がシリカゲル上に導入された非極性相と溶離相との間の極性の差だけを利用して行なわれるため、分離対象物質の極性が互いに類似している場合には、良好な分離が達成できない欠点があった。また、分離対象物質の極性が著しく異なる場合や低い場合には、充填剤への過剰な保持が観察され、この場合、分析時間を短縮するためにグラジエント溶出と呼ばれる特殊な分離操作が必要となり、操作が煩雑となる問題点もあった。

【0004】 一方、シリカゲルを非極性化する方法として、ビフェニル基のような芳香族性の剛直な分子を導入した例が報告されており、この場合、分離が極性の差だけではなく、分子の芳香族性や形状の差を識別して行なわれている。しかしながら、一般に、充填剤の芳香族性はクロマトグラフィーにおけるピークテーリングの原因となり、好ましくないとされている。例えば、液体クロマトグラフィー用充填剤として、芳香族性の高いスチレンージビニルベンゼン共重合体粒子が知られており、イオン交換体やゲル浸透クロマトグラフィー用充填剤として

\* の X を介して結合したシリカゲル粒子。

## 【化 1】

※ 充填剤としての利用は極めて限定されている。これは、スチレンージビニルベンゼン共重合体の芳香族性と溶質の  $\pi$  電子との間の  $\pi$ - $\pi$  相互作用に基づくピークテーリングがしばしば問題となるからである。

【0005】 本発明の目的は、芳香族性の非極性相を用いることなく、分子の形状を識別する逆相分配クロマトグラフィー用充填剤を提供することにある。これは、シリカゲルに担持される非極性相が分子配向性を有することによって達成される。本発明のもう一つの目的は、担持される非極性相が重合体であり、同重合体の片方の末端がシリカゲルに結合した充填剤を提供することにある。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明によれば、一般式 (化 1)

【化 1】 (式中、 $\text{R}_1$  は水素原子又はメチル基を示す。

$\text{R}_2$  は少なくとも  $(\text{CH}_2)_m \cdot \text{CH}_3$  基を含み、 $m$  が 3 ~ 2

1、好ましくは 8 ~ 21 を示す。 $n$  は 2 ~ 200、好ましくは 5 ~ 50 を示す。) で表される重合物が、末端の X を介してシリカゲルに結合した逆相分配クロマトグラフィー用充填剤が提供される。

【0007】 以下、本発明を更に詳細に説明する。本発明の逆相分配クロマトグラフィー用充填剤は、化 1 で表すことができる重合物が、末端の X を介してシリカゲルに結合させることによって得られる充填剤である。

【0008】 化 1 中の  $\text{R}_1$  は水素原子又はメチル基である。 $\text{R}_2$  は炭素数 4 ~ 22 までのアルキル基を含む置換基である。前記  $\text{R}_2$  の炭素数が 4 未満の場合には、疎水性が小さすぎるために、逆相分配クロマトグラフィー用充填剤として保持能力が小さくなり、分離性能が悪く好ましくない。また、前記  $\text{R}_2$  は炭素数が大きいほど、 $\text{R}_2$  間の分子配向性は高くなり、結果として分離能も高くなるが、炭素数 23 以上の化合物は原料の入手が難しく、融点が高すぎるために重合物を得にくいなどの問題があり、実用性に乏しい。前記一般式 (化 1) で表される  $\text{R}_2$  としては、例えばブチルオキシ基、ヘキシルオキシ基、オクチルオキシ基、デシルオキシ基、ドデシルオキシ基、テトラデシルオキシ基、ヘキサデシルオキシ基、オクタデシルオキシ基などの長鎖アルコールのエステル残基やブチルアミノ基、ヘキシルアミノ基、オクチルアミノ基、デシルアミノ基、ドデシルアミノ基、テトラデシルアミノ基、ヘキサデシルアミノ基、オクタデシルア

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

ミノ基などの長鎖アミンによるアミド残基などを好ましく挙げることができ、使用に際しては単独若しくは混合物として用いることができる。

【0009】化1中のXは、化1で表される重合物をシリカゲルに結合させるための官能基であり、例えばプロピルトリメトキシシリル基のように直接シリカゲルと反応し、結合するものがよい。しかしながら、シリカゲルを予めアミノ化あるいはカルボキシル化やヒドロキシル化している場合には、前記Xにはカルボキシル基やヒドロキシル基、アミノ基を含む置換基を利用することができ、この場合、ジシクロヘキシルカルボジイミドのような縮合剤を用いて、化1で表される重合物をシリカゲルに結合させることができる。化1中のYは、特にクロマトグラフィー特性に影響を与えない残基であれば差しつかえなく、水素原子が好ましく挙げられる。

【0010】本発明において、化1で表される重合物は、最も簡便には、前記R<sub>1</sub>とR<sub>2</sub>の条件を満たす化2で表されるモノマーをタクソゲンとし、化3で表すテローゲンをを用いたテロメリゼーション法によって得られる。

【0011】

【化2】  $\text{CH}_2=\text{C}(\text{R}_1)\text{CO}-\text{R}_2$

【0012】

【化3】  $\text{X}-(\text{CH}_2)_p-\text{Y}$

【0013】前記R<sub>1</sub>とR<sub>2</sub>の条件を満たす化2で表されるタクソゲンとしては、ブチルアクリレート、ブチルメタクリレート、ブチルアクリルアミド、ブチルメタクリルアミド、ヘキシルアクリレート、ヘキシルメタクリレート、ヘキシルアクリルアミド、ヘキシルメタクリルアミド、オクチルアクリレート、オクチルメタクリレート、オクチルアクリルアミド、オクチルメタクリルアミド、デシルアクリレート、デシルメタクリレート、デシルアクリルアミド、デシルメタクリルアミド、ドデシルアクリレート、ドデシルメタクリレート、ドデシルアクリルアミド、ドデシルメタクリルアミド、テトラデシルアクリレート、テトラデシルメタクリレート、テトラデシルアクリルアミド、テトラデシルメタクリルアミド、ヘキサデシルアクリレート、ヘキサデシルメタクリレート、ヘキサデシルアクリルアミド、ヘキサデシルメタクリルアミド、オクタデシルアクリレート、オクタデシルメタクリレート、オクタデシルアクリルアミド、オクタデシルメタクリルアミド等を好ましく挙げられる。化3で表されるテローゲンとしては、Xがシリカゲルと直接反応し、結合しうる官能基であり、Yが連鎖移動定数の高い官能基が用いられる。XとYをつなぐスペイサーのアルキル鎖長(p)はとくに限定されないが、実質上、pが2~6のものが合成可能である。このような条件を満たす化3で表されるテローゲンとしては、3-メルカプトプロピルトリメトキシシランを好ましく挙げられるが、シリカゲルを予めアミノ化した粒子に対しては、3

メルカプトブタン酸や5-メルカプトヘキサン酸などが、またシリカゲルを予めカルボキシル化やヒドロキシル化した粒子に対しては、3-メルカプトプロピルアミンや6-メルカプトヘキシルアミンなどが挙げられる。

【0014】本発明において、化1で表される重合物の重合度は少なくとも2~200でなければならない。好ましくは5~50の重合度が適しており、重合度5~50の重合物では側鎖であるR<sub>2</sub>がよく分子配向し、結果として良好な分離能が得られる。重合度51~200の重合物も良く分子配向するが、一個の分子中の化1中の残基Xの割合が低下し、シリカゲルとの反応性が悪くなる。重合度201以上の重合物では、残基Xの割合が著しく低下するだけでなく、溶解性も減少するので、実質上、シリカゲルへの結合が不可能となる。重合度の調節は、3-メルカプトプロピルトリメトキシシランのごとく高い連鎖移動定数を有するメルカプト基をもつテローゲンを利用する場合には、テローゲンとタクソゲンの混合モル比を調整することによって容易に達成できる。

【0015】本発明において、化1で表される重合物をシリカゲル粒子に担持させる方法は、大別して2通りある。化1で表される重合物のXがトリメトキシシリル基のように、直接シリカゲルのシラノール残基と反応しうる場合には、有機溶媒中にシリカゲルと担持させる重合物を混合し、緩やかにかき混ぜながら60~80℃で12時間程度保つことによって重合物をシリカゲルに結合させることができる。有機溶媒としては、四塩化炭素、クロロホルム、テトラヒドロフラン、ジオキサンなどが使用できる。一方、化1で表される重合物のXがカルボキシル基を含む場合には部分アミノ化シリカゲルを用い、また、化1で表される重合物のXがアミノ基やヒドロキシル基を含む場合には部分カルボキシル化シリカゲルを用いて、通常の縮合法により重合物をシリカゲルに結合させることができる。縮合剤としては、ジシクロヘキシルカルボジイミドやジエチルリン酸シアニドなどが使用できる。

【0016】本発明の逆相分配クロマトグラフィー用充填剤は、分離性能を高めるために、担体となるシリカゲルは多孔質球状粒子であることが好ましい。この場合、球径は分離の目的に強く依存するが、分析を主とする利用の場合には、直径が数μm~10μmであり、粒度分布の狭いものが利用される。一方、高速大量分取を主とする利用の場合には、クロマトグラフィーにおける高流速特性を考慮して、より大きな粒径の粒子、例えば数10μmのものが利用される。

【0017】本発明の逆相分配クロマトグラフィー用充填剤は、通常の逆相分配クロマトグラフィー用シリカゲル系充填剤と同様にカラムに充填する方法等によって用いることができる。

【0018】

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

【本発明の効果】本発明の逆相分配クロマトグラフィー用充填剤は、芳香族性をもたない高度に分子配向した非極性相をシリカゲル上に担持させているため、従来の逆相分配クロマトグラフィー用充填剤と同様な分離を達成すると共に、非極性相の分子配向性を利用した分子の形状を識別する逆相分配クロマトグラフィーを提供することができる。更に、担持された非極性相は芳香族性を有しないために、溶質分子との好ましくない $\pi-\pi$ 相互作用を示さない。更に、担持された非極性相は重合体であり、かつ同重合体の片方の末端がシリカゲルに結合しているため柔軟性を有し、そのため温度に伴う分子配向度の変化を示す。この分子配向度の変化を利用すると、溶質の保持時間を制御することができ、従って、過剰保持を示すような溶質においても、特殊なグラジエント溶出法を使用することなく、温度を調節することによって分析時間を短縮することができる。

【0019】

\* 【実施例】以下、本発明を実施例、試験例及び比較例により更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

## 【0020】実施例1

ルアクリレート（タクソーゲン）と3-メルカプトプロピルトリメトキシシラン（テローゲン）をエタノールとともに入れて、窒素ガスを導入しながら10分間かきまぜた。次にアゾビスイソブチロニトリルを開始剤として加え、窒素ガス雰囲気下、80℃、6時間の条件で、表10に示すテローゲンとタクソーゲンの仕込み比においてラジカルテロメリゼーションを行った。室温まで放冷し、G-5ガラスフィルター上で析出物をろ別し、メタノール、アセトンで十分に洗浄、減圧乾燥させて、目的とする重合体を得た。同重合体を以下、ODA<sub>n</sub>と略す。尚、この略号において、nは平均重合度を表す。

## 【0021】

\* 【表1】

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

	実 施 例					
	1	2	3	4	5	6
テロージェン (重量部)	3-メルカプトプロ ピロリメトキシラン (18)	3-メルカプトプロ ピロリメトキシラン (3)	3-メルカプトプロ ピロリメトキシラン (2)	3-メルカプトプロ ピロリメトキシラン (3)	3-メルカプトプロ ピロリメトキシラン (0.5)	3-メルカプトプロ ピロリメトキシラン (2.5)
タクソージェン (重量部)	オクタデシル アクリレート (75)	オクタデシル アクリレート (75)	オクタデシル アクリレート (100)	アシル アクリレート (20)	トデシル メタクリレート (55)	オクタデシル メタクリレート (125)
溶剤 (重量部)	エタノール (800)	エタノール (640)	エタノール (640)	メタノール (200)	エタノール (500)	エタノール (960)
重合温度 (°C)	80	80	80	60	80	80
重合時間 (hr)	6	6	9	6	6	12
重合体収量 (重量部)	72	70	85	18	49	120
重 合 度	24.8	36.4	70.5	19.8	71.2	20.5
相転移温度 (°C)	45.9	51.0	52.0	<-20	5.5	62.5
略 号	ODA <sub>25</sub>	ODA <sub>36</sub>	ODA <sub>71</sub>	BA <sub>20</sub>	DDMA <sub>71</sub>	ODMAA <sub>20</sub>

【0022】得られたODA<sub>n</sub>を重クロロホルムに溶かし、H-NMRにより平均重合度nを決定した。また、示差走査熱量分析により、ODA<sub>n</sub>の相転移温度を決定した。得られたODA<sub>n</sub>とシリカゲル（乾燥状態）を表2に示した混合比で四塩化炭素と共に三口丸底フラスコに入れた。これに攪拌シールと還流冷却管を付し、8 \* 50

\* 0℃の油浴に入れ、12時間攪拌した。攪拌終了後、G5ガラスフィルターで回収し、四塩化炭素で洗浄した後、ろ取によってODA<sub>n</sub>を担持したシリカゲルを得た。元素分析により担持量を決定し、赤外吸収スペクトル及び示差走査熱量分析により、担持物の構造を確認した。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



【0023】

【表2】

	実 施 例					
	1	4	5	6	7	10
テロマー (重量部)	ODA <sub>25</sub> (20)	BA <sub>20</sub> (30)	DDMA <sub>71</sub> (50)	ODMA <sub>20</sub> (68)	AODA <sub>20</sub> (30)	CODA <sub>57</sub> (60)
シリカゲル (重量部)	(12)	(15)	(30)	(25)	(15)	(30)
溶剤 (重量部)	四塩化炭素 (240)	四塩化炭素 (240)	クロロホルム (800)	クロロホルム (2380)	テトラヒドロフラン (2380)	テトラヒドロフラン (4800)
反応温度 (°C)	80	80	60	60	30	30
反応時間 (hr)	6	12	12	12	48	48
担持量 (重量部)	3.2	4.2	7.5	4.1	3.9	4.2
略 号	粒子A	粒子B	粒子C	粒子D	粒子E	粒子F

## 【0024】実施例2～6

タクソージェンの種類及びその仕込み比、溶媒、反応温度等を表1に示す通り変えた以外は、実施例1と同様な方法で目的とする重合物を得た。重合物の略号は使用したタクソージェンの種類によって作成し、表1中に示した。尚、この略号において、nは平均重合度を表す。重合物のシリカゲル上への担持は、実施例1と同様な方法で重合物をシリカゲルに担持させた。

## \* 【0025】実施例7

40 テローゲンの種類及びその仕込み比、溶媒、反応温度等を表3に示す通り変えた以外は、実施例1と同様な方法で目的とする重合物を得た。重合物の略号は使用したテローゲンの種類によって作成し、表3中に表した。尚、この略号において、nは平均重合度を表す。

【0026】

【表3】

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

	実 施 例			
	7	8	9	10
テローゲン (重量部)	3-メルカプトプロ ピルアミン (3)	3-メルカプトプロ ピルアミン (8.5)	3-メルカプトプロ ピルアミン (2)	3-メルカプトプロ ピルアミン (2)
タクソゲン (重量部)	オクタデシル アクリレート (50)	オクタデシル アクリレート (70)	オクタデシル アクリレート (100)	オクタデシル アクリレート (100)
溶剤 (重量部)	エタノール (400)	ベンゼン (870)	ベンゼン (870)	エタノール (800)
重合温度 (°C)	80	75	75	80
重合時間 (hr)	6	12	12	6
重合体収量 (重量部)	36	77	72	54
重 合 度	19.7	8.0	42.7	57.3
相転移温度 (°C)	>80	42.2	50.1	50.3
略 号	AODA <sub>20</sub>	AODA <sub>8</sub>	AODA <sub>41</sub>	CODA <sub>57</sub>

【0027】得られた重合物と部分アミノ化シリカゲル（乾燥状態）を表2に示した混合比でテトラヒドロフランと共に三口丸底フラスコに入れた。これにジジクロヘキシルカルボジイミドを加え、攪拌シールと還流冷却管を付し、室温で24時間攪拌した。攪拌終了後、G5ガラスフィルターで回収し、テトラヒドロフランで洗浄した後、ろ取によって重合物を担持したシリカゲルを得た。元素分析により担持量を決定し、赤外吸収スペクトル及び示差走査熱量分析により、担持物の構造を確認した。

#### 【0028】実施例8～10

テローゲンの種類及びその仕込み比、溶媒、反応温度等を表3に示す通り変えた以外は、実施例1と同様な方法で目的とする重合物を得た。重合物の略号は使用したテローゲンの種類によって作成し、表3中に示した。尚、この略号において、nは平均重合度を表す。重合物のシリカゲル上への担持は、重合物とシリカゲルの混合比および反応溶媒、温度等を表2に示す通り変えた以外は、実施例7と同様な方法で重合物をシリカゲルに担持させた。

#### 【0029】試験例1

粒子D3. 3g（乾燥状態）、1-ヘキサノール 15ml、クロロホルム 15mlを100mlビーカーに入れ、超音波洗浄器を用いて約15分間分散させた。こ

30 \*れを直径4.6mm、長さ30cmのステンレスカラムに接続したパッカーに入れ、空隙を1-ヘキサノールとクロロホルムの混合溶媒（1：1）で満たした後、流速8ml/minでクロロホルムを流した。圧力が450kg/cm<sup>2</sup>になるように流速を調整し、さらに30分間同圧力でクロロホルムを流した。カラムをパッカーから外しフィルターを付け、流速1ml/minで100mlのクロロホルム、100mlのメタノールを流して充填を完了した。サンプルとしてベンゼン、エチルベンゼン、ブチルベンゼン、ヘキシルベンゼン、オクチルベンゼンを用い、溶離液にメタノール/水（9：1）として液体クロマトグラフィーを実施した。図1に示すように、すべてのサンプルが完全に分離したクロマトグラムを得た。

#### 【0030】試験例2

粒子Aを試験例1と同様な方法でカラムに充填した後、サンプルとして非平面性のo-テルフェニルと平面性のトリフェニレンを用い、溶離液にメタノールを用いて液体クロマトグラフィーを実施した。図2に示すように、2つのサンプルが完全に分離したクロマトグラムを得た。分離能の尺度となるα値は4.5であった。

#### 【0031】試験例3

試験例2で作製したカラムについて、サンプルとして多環芳香族性化合物としてベンゼン、ナフタレン、アント

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

ラセン、ピレン、トリフェニレンを用い、溶離液にメタノールを用いて液体クロマトグラフィーを実施した。図3に示すように、好ましくないピークテーリングはなく、すべてのサンプルが完全に分離できることを確認した。

#### 【0032】試験例4

試験例2で作製したカラムについて、サンプルとしてアントラセンとトリフェニレンを用い、溶離液にメタノールを用いて温度を変えて液体クロマトグラフィーを実施した。その結果、保持時間に対する特殊な温度依存性を示すグラフ(図4)を得た。尚、保持時間が著しく変化する温度が、担持した非極性相の相転移温度に一致することを確認した。

#### 【0033】比較例1

市販の逆相分配クロマトグラフィー用充填剤としてODSを用い、試験例4と同様な検討を行なった。o-テルフェニルとトリフェニレンの分離能 $\alpha$ 値はわずかに1.4であった。

#### 【0034】比較例2

市販の逆相分配クロマトグラフィー用充填剤としてODSを用い、試験例3と同様な検討を行なった。保持時間に対する直線的な温度依存性を示すグラフ(図5)を得 \*

\*た。尚、使用したODSは、測定温度範囲内でまったく相転移挙動を示さないことを示差走査熱量分析により確認した。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】粒子Dを用い、ベンゼン、エチルベンゼン、ブチルベンゼン、ヘキシルベンゼン、オクチルベンゼンの混合物の分離を試験した試験例1におけるクロマトグラムを示す。

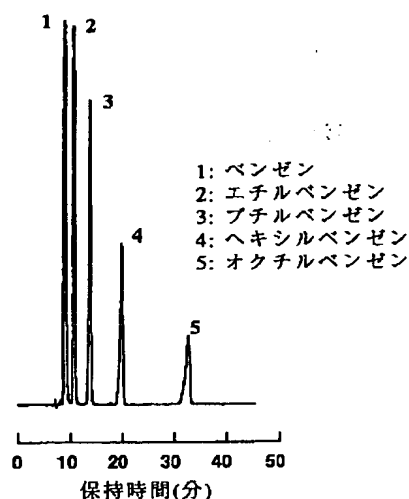
【図2】粒子Aを用い、o-ターフェニルとトリフェニレンの混合物の分離を試験した試験例2におけるクロマトグラムを示す。

【図3】粒子Aを用い、ベンゼン、ナフタレン、アントラセン、ピレン、トリフェニレンの混合物の分離を試験した試験例3におけるクロマトグラムを示す。

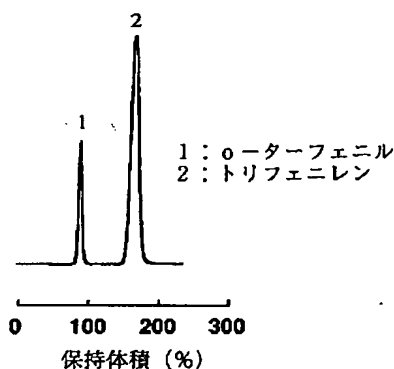
【図4】試験例4において、粒子Aのアントラセン及びトリフェニレンに対する保持能を温度に対してプロットした結果を示す。図中のTは粒子Aの相転移温度を示す。

【図5】比較例2において、ODSのアントラセン及びトリフェニレンに対する保持能を温度に対してプロットした結果を示す。

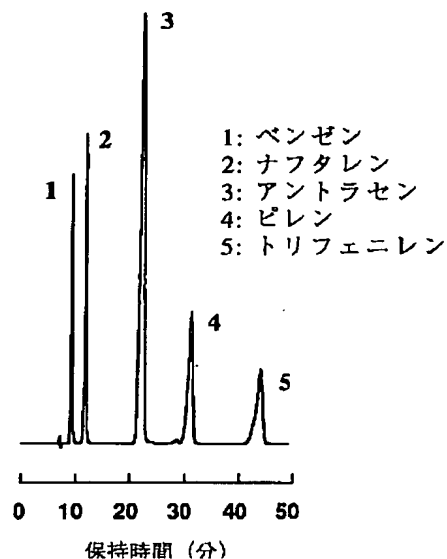
【図1】



【図2】

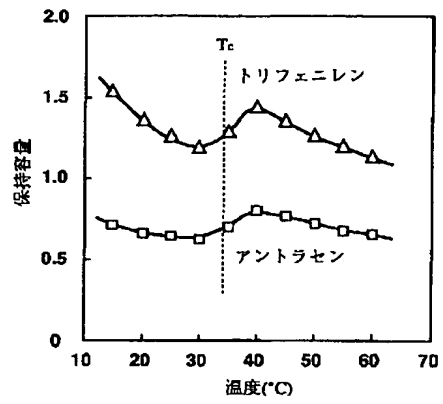


【図3】

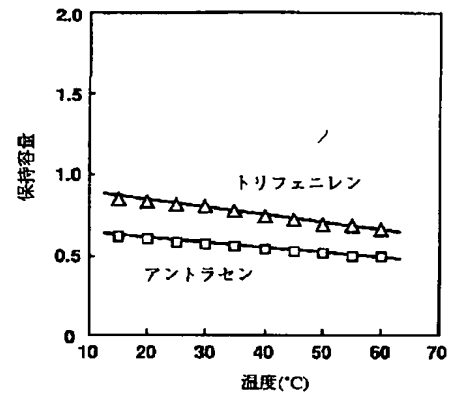


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

【図 4】



【図 5】



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**